

[美] I. H. 西格尔 著

生物化学计算

科学出版社



58.173
207

生物化学计算

怎样解决普通生物化学中的数学问题

〔美〕I. H. 西格尔 著

吴经才 张光兴 静天玉 等 译



012456

科学出版社

1983

中科院植物所图书馆



S0017424

内 容 简 介

本书主要阐述：水溶液和酸-碱化学、生物分子的化学、生物化学能学、酶、分光光度法及其它光学方法和生物化学中的同位素等涉及计算方面的理论及例题，并附有练习题和答案。可供生物化学和有关的科技工作者、大专院校师生参考。

Irwin H. Segel

BIOCHEMICAL CALCULATIONS

2ND EDITION 1976

John Wiley & Sons, Inc.

生 物 化 学 计 算

怎样解决普通生物化学中的数学问题

〔美〕I. H. 西格尔 著

吴经才 张光兴 静天玉 等 译

责任编辑 赵甘泉

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1983 年 2 月第 一 版 开本：787×1092 1/16
1983 年 2 月第一次印刷 印张：20 1/4
印数：0001—7,850 字数：481,000

统一书号：13031·2142

本社书号：2930·13-10

定 价：3.10 元

译 者 的 话

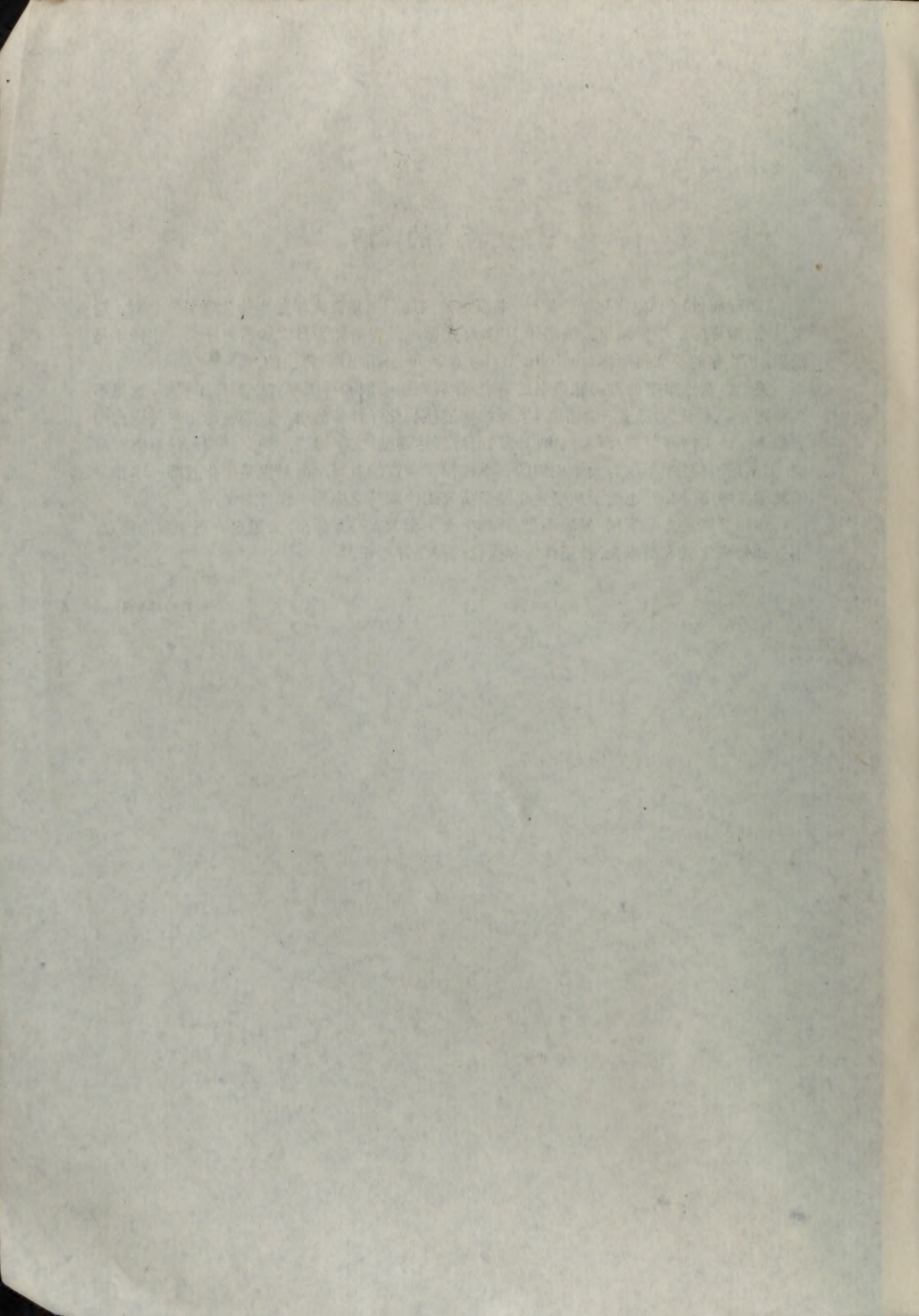
I. H. Segel 的《生物化学计算》一书原是美国加利福尼亚大学的生物化学补充教材, 后来, 被美国许多大学所采用. 该书于 1968 年出版, 并先后译为日文和西班牙文. 中译本是根据 1976 年的英文再版本(由 John Wiley & Sons 公司出版)译出的.

关于出版这本书的目的和该书的特点, 作者在第一版和再版序言中都作了说明, 这里不再重述. 译者认为, 这是一本很好的、系统阐述生物化学计算的书, 这类参考书目前国内尚属缺乏. 该书内容新颖, 深入浅出; 计算详尽, 表达简捷; 文字简练, 图文并茂. 每章都有习题, 书末附有答案, 不仅为大学生们的自学提供了丰富的资料, 而且也是生化教师一本很好的教学参考书; 同时, 也适于从事生化基础研究工作或其它生化工作者参考.

由于译者的水平所限, 经验不足, 再加上全书由数人分章译出, 文风定有不一致的地方, 不妥或错误之处在所难免, 希望读者和生化同行批评指正.

译 者

1982 年 6 月



序 言

《生物化学计算》自第一版出版以来,六年中已被美国许多高等院校作为补充教科书使用,并译成了日文和西班牙文。承蒙讲师和学生们的建议以及我本人的愿望:给定量生物化学以更广泛而均衡的描述,由此便产生了这个新的版本。我的目的仍在于:向学生们介绍生物化学所发现的事实的数学基础并证明现代生物化学并不仅仅是结构和途径的记录。

本版与第一版在几个方面有所不同。首先,描述性题材(以前在附录中)已归入教科书的正文,从而例题紧接在相应理论之后出现。本书的主要重点仍放在数字题解方面,而很少重复标准生物化学教科书中的描述性题材。其次,编入了种类更为繁多的例题。例如,显著地减少了水溶液和酸-碱化学题材的数量,但其范围扩充了,包含了一些新的题目,例如血液缓冲剂。新增加了“生物分子的化学”一章,关于生化能学的题材,新版包含有焓和焓的变化、活化能以及膜运转的和光合作用的能学。解这些例题并不需要预先学习物理化学。第四章“酶”包括有关平衡结合研究、抑制剂、酶的单位和分析, pH 和温度的效应以及别构酶动力学的新题材。介绍双底物酶动力学机制时未涉及复杂的数学。第五章“分光光度法及其它光学方法”,包括有关于蛋白质测定、荧光测定法和旋光性的一些新例题。关于生物半衰期、前体-产物关系、双标记闪烁计数和计数误差的新例题加在第六章“生物化学中的同位素”中。虽然本版的篇幅扩大了,但论题及例题仍维持在和现代的概论性的普通生物化学课程相适应的水平上。

欧文 H. 西格尔

加利福尼亚,戴维斯

1975年9月

第一版序言

生物化学是一门定量的科学。然而，此学科往往以纯描述方式加以讲授。这种情况是可以理解的，因为许多生物科学的学生仅以一门普通化学和一门初等有机化学做为进而学习普通生物化学的必修课程。《生物化学计算》的编写是为了向学生们介绍基础课程中要讨论的生物化学方面的某些数学概貌。讨论到的例题中所需数学知识并未超出普通化学所要求的范围。极少数例题，在应用了初等微积分时，还同时给出了代数近似计算。为了使本书尽可能对学生有用，几乎每道例题均详加求解。例题中没有“重整项和对 α 求解”的陈述。本书是为了用以配合普通生物化学标准教科书使用的。尽管如此，附录里还是提供了相当数量的说明性背景材料(包括数学推导)。

《生物化学计算》的油印本曾于1966—1967年在戴维斯校园里为800多名学生使用，其中多数是我们普通生物化学课程的学生。其余许多人是为了取得硕士和博士学位而学习的研究生。正是这些学生的反响，激励着我将此书提交出版和普遍发行。

欧文 H. 西格尔

加利福尼亚，戴维斯

1968年10月

(静天玉译 张光兴校)

目 录

第一章 水溶液和酸-碱化学	1
A. 水溶液	1
B. 平衡常数	7
C. 酸和碱	8
D. 实验室缓冲剂	25
E. 氨基酸和肽	52
F. 血液缓冲剂	62
练习题	68
第二章 生物分子的化学	71
A. 氨基酸、肽和蛋白质	71
B. 碳水化合物	93
C. 脂类	97
D. 核苷酸与核酸	101
练习题	106
第三章 生物化学能学	109
A. 能量产生和能量需要的反应	109
B. 平衡浓度的计算	127
C. 氧化还原反应	129
D. 新陈代谢与 ATP 的产生	135
E. 光合磷酸化	140
F. 主动转运	145
G. 焓和熵	147
H. 活化能	151
练习题	153
第四章 酶	156
A. 酶作为生物催化剂	156
B. 酶动力学	160
C. 反应级数	168
D. 酶动力学数据的作图方法	174
E. 酶的抑制作用	183
F. pH 对酶稳定性和活力的影响	203
G. 温度对酶稳定性和活力的影响	206
H. 酶的测定方法	208
I. 多底物酶及其动力学机制	216
J. 多部位酶和别构酶	223
K. 酶的转换	233
练习题	234

第五章 分光光度法及其它光学方法	239
A. 分光光度法	239
B. 荧光法	255
C. 旋光——旋光测定法	257
练习题	259
第六章 生物化学中的同位素	261
A. 同位素和放射衰变	261
B. 放射性化合物的溶液	267
C. 使用放射性底物的测定法	269
D. 双重标记分析法	274
E. 生物的半衰期——转换	277
F. 放射性示踪物与稀释分析法	281
G. 计数中的误差	287
H. 稳定的同位素	289
练习题	289
附录	292
I 商用酸和碱浓溶液的性质	292
II 用固体硫酸铵分级	292
III 用饱和硫酸铵溶液分级	293
IV 用于制备缓冲剂的酸和碱的 pK_a 值	294
V 水溶液中离子的活性系数	296
VI 用于离子强度的 pK_a 校正因子	296
VII 常见氨基酸的电离常数, pK_a , pK_b 和 pI 数值	297
VIII $\Delta G'$ 值用于具有生物学重要意义的化合物的水解作用	298
IX 氧化还原电极反应的标准还原电位	299
X 具有生物化学重要意义的化合物的吸收最大值和吸收系数	300
XI 碳水化合物及其衍生物的比旋	301
XII 放射性同位素在生物学研究中的应用	301
练习题答案	303
对数表	314
元素的原子序数和原子量	316

第一章 水溶液和酸-碱化学

A. 水 溶 液

生物化学家所研究的大多数反应均发生在溶液中。因而，从复习溶液浓度的各种表示方法和换算方法开始进行我们的数学综述是适宜的。

基于体积的浓度

生化实验室中，最广泛使用的浓度是根据单位体积所溶溶质的量表示的。最常用的几种习惯表示法定义如下：

$$\text{摩尔浓度}(M) = \text{每升溶液所含溶质的摩尔数} \quad (1)$$

摩尔浓度通常用方括弧表示，例如， $[H^+] = H^+$ 离子的摩尔浓度。为了计算 M ，需知所溶溶质的重量及其分子量 MW 。

$$\frac{\text{重量(克)}}{MW} = \text{摩尔数} \quad (2)$$

稀溶液浓度往往用毫摩尔浓度、微摩尔浓度等等来表示。其中

$$1 \text{ 毫摩尔} = 10^{-3} \text{ 摩尔}$$

$$1 \text{ 微摩尔} = 10^{-6} \text{ 摩尔}$$

$$1 \text{ 纤摩尔} = 1 \text{ 毫微摩尔} = 10^{-9} \text{ 摩尔}$$

$$1 \text{ 沙摩尔} = 1 \text{ 微微摩尔} = 10^{-12} \text{ 摩尔}$$

所以

$$1 \text{ 毫 } M = 10^{-3} M = 1 \text{ 毫摩尔/升} = 1 \text{ 微摩尔/毫升}$$

$$1 \text{ 微 } M = 10^{-6} M = 1 \text{ 微摩尔/升} = 1 \text{ 毫微摩尔/毫升}$$

$$1 \text{ 纤 } M = 10^{-9} M = 1 \text{ 毫微摩尔/升} = 1 \text{ 微微摩尔/毫升}$$

$$1M \text{ 溶液含有一阿伏加德罗(Avogadro)常数的分子}$$

$$\text{阿伏加德罗常数} = \text{每克分子的分子数}$$

$$= \text{每克原子的原子数}$$

$$= \text{每克离子的离子数}$$

$$= 6.023 \times 10^{23}$$

在实际应用中，一阿伏加德罗数质点(即，1克分子或1克原子或1克离子)常常称之为“摩尔”，不管该物质本质上是离子、单原子还是分子。例如，35.5克 Cl^- 离子可以叫做一“摩尔”而不称为一“克离子”。

$$\text{活度}(a) = \text{溶质的有效的或表现的摩尔浓度} \quad (3)$$

活度和实际摩尔浓度之间的关系如下：

$$a = \gamma[M] \quad (4)$$

式中， γ = 活度系数(即实际浓度的有效分数)。由于溶质分子间的相互作用阻碍了溶质分

子的充分表现(full expression), γ 通常小于 1. 例如, $0.1 M HCl$ 溶液是完全解离的, 然而此溶液表现出好象仅含有 $0.086 M H^+$, 于是 $\gamma = 0.86$.

$$\text{当量浓度}(N) = \text{每升溶液所含溶质的当量数} \quad (5)$$

为了计算 N , 需知溶质溶解的重量及其克当量 EW .

$$\frac{\text{重量(克)}}{EW} = \text{克当量数} \quad (6)$$

1 克当量(即 EW)的酸或碱是含有 1 克原子(1 摩尔)可取代氢或 1 克离子(1 摩尔)可取代羟基的酸或碱的重量. 参加氧化-还原反应的化合物, 其 EW 则是提供或接受 1 法拉第(1 摩尔)电子的该化合物的重量. 一般来说:

$$EW = \frac{MW}{n} \quad (7)$$

式中, n = 每分子(酸或碱)可取代的 H^+ 或 OH^- 数; 或 n = 每分子(氧化剂或还原剂)失去或得到的电子数.

摩尔浓度和当量浓度之间的关系如下:

$$N = nM \quad (8)$$

例如, $0.01 M H_2SO_4$ 溶液的当量浓度是 $0.02N$.

$$\text{重量/体积百分浓度}(\% \text{ 重量/体积}) = \text{每 } 100 \text{ 毫升溶液所含溶质的克重} \quad (9)$$

例行实验室溶液常用重量/体积百分浓度表示, 因精确浓度是不太重要的.

$$\text{毫克百分浓度(毫克 \%)} = \text{每 } 100 \text{ 毫升溶液所含溶质的毫克重} \quad (10)$$

临床实验室中常常使用毫克百分浓度. 例如, 临床血糖值 225 是指每 100 毫升血清含葡萄糖 225 毫克.

$$\text{等渗摩尔浓度(Osmolarity)} = \text{溶液中质点的摩尔浓度} \quad (11)$$

不可解离溶质的 $1M$ 溶液也是 1 等渗摩尔 (Osmolar) (该溶液每升含 6.023×10^{23} 个点). $1M$ 可解离的盐溶液是 n 等渗摩尔, 此处 n 为每分子盐所产生的离子数. 于是, $0.03 M KCl$ 溶液为 0.06 等渗摩尔. 生理学研究时常要考虑到等渗摩尔浓度, 因为必须将组织或细胞浸在与该原生质等渗摩尔浓度相同的溶液中, 以防止吸收或逸出水分. 血浆为 0.308 等渗摩尔. 因此, 红血球悬浮在 0.308 等渗摩尔 $NaCl$ 溶液 ($0.154M$) 中既不会收缩也不会膨胀. 对红血球来说, 该 $0.154 M NaCl$ 溶液就叫做等渗溶液.

例题 1-1

(a) 配制 $0.04 M NaOH$ 溶液 500 毫升需多少克固体 $NaOH$? (b) 将该溶液的浓度用 N 、克/升、% 重量/体积、毫克 % 和等渗摩尔浓度表示.

解:

$$(a) \quad \text{体积(升)} \times M = \text{所需 } NaOH \text{ 的摩尔数}$$

$$0.5 \times 0.04 = 0.02 \text{ 摩尔(所需 } NaOH)$$

$$\text{摩尔数} = \frac{\text{重量(克)}}{MW}$$

$$0.02 = \frac{\text{重量(克)}}{40}$$

$$\text{重量} = 0.8 \text{ 克}$$

∴ 称取 0.8 克, 溶于水中并稀释至 500 毫升

(b) 每分子 NaOH 含有一个 OH⁻.

∴ $M = N$, 且该溶液为 **0.04 N**

该溶液含 NaOH 为 0.8 克/500 毫升或 **1.6 克/升**. % (重量/体积) = 每 100 毫升的克数, 1.6 克/升 = 0.16 克/100 毫升 = **0.16%**. 毫克 % = 每 100 毫升的毫克数, 0.16 克/100 毫升 = 160 毫克/100 毫升 = **160 毫克 %**.

每分子 NaOH 产生两个质点 (Na⁺ 和 OH⁻)

∴ 等渗摩尔浓度 = $2 \times M = \mathbf{0.08}$ 等渗摩尔

例题 1-2

配制 0.002 M 的 H₂SO₄ 溶液 1500 毫升需 5 M H₂SO₄ 多少毫升?

解:

稀溶液中硫酸的摩尔数与从浓溶液中所取硫酸的摩尔数相等.

体积(升) × M (稀溶液) = 体积(升) × M (浓溶液)

$$1.5 \times 0.002 = \text{体积(升)} \times 5$$

$$\frac{1.5 \times 0.002}{5} = \text{所需浓硫酸的体积(升)}$$

$$\frac{3 \times 10^{-3}}{5} = 0.6 \times 10^{-3} \text{ 升} = \mathbf{0.6 \text{ 毫升}}$$

∴ 取 0.6 毫升浓硫酸并稀释至 1.5 升

$$\text{离子强度} \left(\frac{I}{2} \right) = \frac{1}{2} \sum M_i Z_i^2 \quad (12)$$

式中, M_i = 离子的摩尔浓度;

Z_i = 离子的净电荷 (不考虑符号);

Σ = 表示“加合”的符号.

离子强度可以度量溶液中的电荷浓度. 当溶液的离子强度增大时, 离子的活度系数减小. 离子强度和可解离盐溶液的摩尔浓度之间的关系取决于生成的离子数及其净电荷, 兹归纳如下:

盐		离子强度
类 型	实 例	
1:1	KCl, NaBr	M
2:1	CaCl ₂ , Na ₂ HPO ₄	$3 \times M$
2:2	MgSO ₄	$4 \times M$
3:1	FeCl ₃ , Na ₃ PO ₄	$6 \times M$
2:3	Fe ₂ (SO ₄) ₃	$15 \times M$

“类型”系指离子的净电荷而言. 于是, 产生 Mg²⁺ 和 SO₄²⁻ 的 MgSO₄ 就叫做 2:2 类型的盐. 产生 HPO₄²⁻ 和 Na⁺ 离子的 Na₂HPO₄ 称作 2:1 类型的盐.

在计算离子强度时, 仅用离子的净电荷. 因此, 未解离的化合物 (如未解离醋酸) 或携带正、负电荷数相等的一类化合物 (如中性氨基酸) 并不增强溶液的离子强度.

例题 1-3

计算 $0.02 M \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 溶液的离子强度。

解:

$$\frac{I}{2} = \frac{1}{2} \sum M_i Z_i^2 = \frac{1}{2} [M_{\text{Fe}^{3+}} Z_{\text{Fe}^{3+}}^2 + M_{\text{SO}_4^{2-}} Z_{\text{SO}_4^{2-}}^2]$$

$0.02 M \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 产生 $0.04 M \text{Fe}^{3+}$ 和 $0.06 M \text{SO}_4^{2-}$

$$\begin{aligned} \frac{I}{2} &= \frac{(0.04)(3)^2 + (0.06)(-2)^2}{2} = \frac{(0.04)(9) + (0.06)(4)}{2} \\ &= \frac{(0.36) + (0.24)}{2} = \frac{0.60}{2} \\ \frac{I}{2} &= 0.30 \end{aligned}$$

或者, 根据预先计算好的 2:3 盐关系求出:

$$\frac{I}{2} = 15 \times M = (15)(0.02) = 0.30$$

基于重量的浓度

重量/重量百分浓度(% 重量/重量) = 每 100 克溶液所含溶质的克重 (13)

许多商用酸的浓度是用 % 重量/重量表示的。为了计算配制一定浓度的制剂所需该原储液的体积, 我们必须知道其密度或比重。这里,

ρ = 密度 = 单位体积的重量

SG = 比重 = 相对于水的密度。由于水的密度是 1 克/毫升,

从数字上看, 比重和密度相等。

例题 1-4

从浓 HCl 溶液 (28% 重量/重量, SG = 1.15) 出发, 配制 $0.4 M \text{HCl}$ 2 升, 叙述其配制方法。

解:

体积(升) $\times M$ = 摩尔数 $2 \times 0.4 = 0.80$ 摩尔(所需 HCl)

重量(克) = 摩尔数 $\times MW$ 重量(克) = 0.80×36.5

重量(克) = 29.2 克(所需纯 HCl)

该原储液并非纯 HCl, 而仅是重量百分数为 28% 的 HCl。

\therefore 所需原储液: $\frac{29.2}{0.28} = 104.3$ 克

我们可以计算所需原储液体积, 而不去称量 104.3 克的原储液。

所需原储液体积(毫升): $\frac{\text{重量(克)}}{\rho \text{ (克/毫升)}} = \frac{104.3}{1.15} = 90.7$ 毫升

\therefore 量取 90.7 毫升原储液并用水稀释至 2 升。

上述全部关系(重量、密度和 % 重量/重量)可以合并成一个表达式:

$$wt_{\text{克}} = vol_{\text{毫升}} \times \rho_{\text{克/毫升}} \times \% \text{ (写成小数)}$$

式中, $wt_{\text{克}}$ = 所需纯物质重量(克);

$\text{vol}_{\text{毫升}} = \text{原稀储液体积(毫升)}$;

$\% = \text{纯物质重量占总重量的分数}$.

$$\therefore \text{vol} = \frac{\text{wt}_{\text{克}}}{\rho \times \%} = \frac{29.2}{1.15 \times 0.28} = 90.7 \text{ 毫升}$$

另外一个方法是, 可以计算该原储液的摩尔浓度. 首先, 计算一升原储液中纯 HCl 的重量.

$$\text{wt} = \text{vol} \times \rho \times \%$$

$$\text{wt}_{\text{克}} = 1000 \text{ 毫升} \times 1.15 \text{ 克/毫升} \times 0.28$$

$$\text{wt} = 322 \text{ 克}$$

换句话说, 1000 毫升(1 升)原储液含有 322 克纯 HCl.

$$\text{摩尔数} = \frac{\text{wt}_{\text{克}}}{\text{MW}} = \frac{322}{36.5} = 8.82$$

\therefore 该浓原储液的摩尔浓度为 8.82 M

我们需要 0.80 摩尔.

$$\text{体积(升)} = \frac{\text{摩尔数}}{M} = \frac{0.80}{8.82} = 0.0907 \text{ 升}$$

\therefore 取 0.0907 升(90.7 毫升)原储液并稀释至 2 升

$$\text{重量摩尔浓度}(m) = 1000 \text{ 克溶剂所含溶质的摩尔数} \quad (14)$$

重量摩尔浓度用于某些物理化学计算(如, 计算沸点升高和冰点降低). 对于稀的水溶液, m 和 M 将非常接近. 为了 m 和 M 的相互变换, 需知 % 重量/重量.

$$\text{摩尔分数} = \text{有关化合物的摩尔数占总摩尔数的分数} \quad (15)$$

例如, 某溶液中含有 n_1 摩尔的化合物 1、 n_2 摩尔的化合物 2 及 n_3 摩尔的化合物 3. 那么, 化合物 2 的摩尔分数 MF_2 为

$$\text{MF}_2 = \frac{n_2}{n_1 + n_2 + n_3}$$

在物理化学的某些计算中, 化合物的摩尔分数很重要, 但在生物化学中并不常用.

例题 1-5

计算(a)例题 1-4 所述 HCl 原储液的摩尔浓度; (b)该溶液中 HCl 的摩尔分数.

解:

(a)该溶液含 HCl 28% 重量/重量或每 100 克溶液含 HCl 28 克, 或每 $(100 - 28) = 72$ 克水含 HCl 28 克.

$$\frac{28 \text{ 克 HCl}}{72 \text{ 克 H}_2\text{O}} \times 1000 = 388.9 \text{ 克 HCl/1000 克 H}_2\text{O}$$

$$\frac{\text{wt}_{\text{克}}}{\text{MW}} = \text{摩尔数} \quad \frac{388.9}{36.5} = 10.65 \text{ 摩尔 HCl/1000 克 H}_2\text{O}$$

\therefore 该溶液为 10.65 m

(b)例如, 在 100 克溶液中, 有

$$\frac{28 \text{ 克 HCl}}{36.5 \text{ 克/摩尔}} = 0.767 \text{ 摩尔 HCl}$$

而

$$\frac{72 \text{ 克 } H_2O}{18 \text{ 克/摩尔}} = 4.0 \text{ 摩尔 } H_2O$$
$$MF_{HCl} = \frac{n_{HCl}}{n_{HCl} + n_{H_2O}} = \frac{0.767}{4.767}$$
$$MF_{HCl} = 0.161$$

基于饱和度的浓度

蛋白质常用中性盐借助于分级沉淀法加以提纯。为了这一目的，虽然有时也用 NaCl，但硫酸铵是最常用的盐。用于“盐析”蛋白质的硫酸铵，其浓度几乎总是用“饱和百分率”表示的。

饱和百分率 = 以一定温度下可能达到的最大浓度百分数表示的溶液中的盐浓度 (16)
为了考虑到当大量盐加入水溶液中所引起的体积变化，我们需知该盐的比容。这里

$$\bar{v} = \text{比容} = 1 \text{ 克盐占有的体积(毫升/克)} = \text{密度的倒数}$$

例题 1-6

固体硫酸铵的比容为 0.565 毫升/克，0°C 时硫酸铵的溶解度是 706 克/1000 克水¹⁾。计算(a) 0°C 时饱和硫酸铵溶液的浓度，和(b) 0°C 时使 500 毫升饱和度为 40% 的硫酸铵溶液变成饱和度为 60% 时必须加入的固体硫酸铵量。

解：

(a) 0°C 时饱和硫酸铵溶液是把 706 克硫酸铵(AS)加到 1000 克 H₂O 中配制而成，其所占体积为

$$1000 \text{ 毫升} + (706)(0.565) \text{ 毫升} = 1399 \text{ 毫升}$$

在此溶液中，AS 的浓度为

$$\frac{706}{1399} = 0.505 \text{ 克/毫升} = 505 \text{ 克/升}$$

AS 的 MW 为 132.14，故该溶液的摩尔浓度是

$$\frac{505}{132.14} = 3.82 M$$

(b) 我们可以导出一个简单公式，用以表示为使原始饱和度 S_1 变为另一不同饱和度 S_2 时对 1000 毫升该溶液所必须加入的固体 AS 量。

$$S_2 = \frac{(\text{原始 AS 的 } wt_x) + (\text{添加 AS 的 } wt_x)}{(\text{以毫升表示的最终溶液的体积})(0.505 \text{ 克/毫升})}$$
$$= \frac{(1000 \text{ 毫升})(0.505 \text{ 克/毫升})(S_1) + (wt_x)}{[1000 \text{ 毫升} + 0.565(wt_x)]0.505 \text{ 克/毫升}}$$
$$wt_x = \frac{505(S_2 - S_1)}{1 - 0.285 S_2} \quad (17)$$

式中， wt_x = 加入 1000 毫升溶液中的固体 AS 重量；

S_2 = 以小数表示的最终饱和度；

S_1 = 以小数表示的原始饱和度；

1) 不同出处，数值稍异。如 0°C 时，附录 II 所列数值为 697 克/升，附录 III 则为 706.8 克/升。

505=100% 饱和度时每 1000 毫升中的 AS 克数.

$$\begin{aligned}\therefore \text{wt}_x &= \frac{505(0.60-0.40)}{1-0.285(0.60)} = \frac{101}{0.829} \\ &= 121.8 \text{ 克/升 或 } 60.9 \text{ 克/500 毫升}\end{aligned}$$

例题 1-7

为了使 40 毫升饱和度为 20% 的硫酸铵溶液成为 70% 的饱和度, 必须加入多少毫升饱和硫酸铵溶液? 假设体积是可以加合的.

解:

$$(40 \text{ 毫升})(0.20) + (X \text{ 毫升})(1.00) = (40 + X \text{ 毫升})(0.70)$$

$$8 + X = 28 + 0.70 X$$

$$0.3 X = 20$$

$$X = 66.7 \text{ 毫升}$$

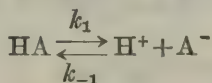
一般说来, 使 100 毫升饱和度为 S_1 (以小数表示) 的溶液变到饱和度为 S_2 时, 所需加入的饱和硫酸铵溶液的体积为

$$\text{vol}_{\text{sat}} = \frac{100(S_2 - S_1)}{(1 - S_2)} \quad (18)$$

(用硫酸铵分级沉淀纯化酶时, 通常使用附录 II 和附录 III 中所列的表.)

B. 平衡常数

自然界中很多反应都是可逆的, 而且不能进行到底. 即, 这些反应在 0 到 100% 反应之间的某点上明显地停留下来或平衡于该点. 平衡时, 正反应的绝对速度恰好等于逆反应的绝对速度, 因而净反应速度为零. 平衡状态可以借助于平衡常数 $K_{\text{平}}$ 方便地加以描述. 例如, 考虑一个弱酸的解离 (下面我们将对它进行详细地讨论).



正向反应速度 v_f 与 HA 的浓度成正比

$$v_f \propto [\text{HA}] \text{ 或 } v_f = k_1[\text{HA}]$$

式中, k_1 是比例常数, 叫做速度常数 (因为 v_f 与单一物质浓度的一次方成正比, 特称之为一级速度常数). 逆反应速度 v_r 与 H^+ 和 A^- 的浓度成正比, 所以它与 A^- 和 H^+ 浓度的乘积成正比.

$$v_r \propto [\text{H}^+] \text{ 和 } v_r \propto [\text{A}^-]$$

$$\therefore v_r \propto [\text{H}^+][\text{A}^-] \text{ 或 } v_r = k_{-1}[\text{H}^+][\text{A}^-]$$

式中, k_{-1} 为二级速度常数. 于是, $[\text{H}^+]$ 加大一倍使 v_r 也加大一倍, $[\text{A}^-]$ 加大一倍也使 v_r 加大一倍; $[\text{H}^+]$ 和 $[\text{A}^-]$ 都加大一倍则使 v_r 加大四倍. 平衡时

$$v_f = v_r$$

或
$$k_1[\text{HA}] = k_{-1}[\text{H}^+][\text{A}^-] \text{ 或 } \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

此二常数比 k_1/k_{-1} 仍为一常数, 并定义为 K_{\mp} :

$$K_{\mp} = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (19)$$

在此特殊情况下, K_{\mp} 是一个酸的解离常数并常以 K_a 表示.

如果所提及的反应是 $\text{A} + \text{B} \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} 2\text{C}$, 那么

$$v_f = k_1[\text{A}][\text{B}] \quad \text{和} \quad v_r = k_{-1}[\text{C}]^2$$

$$\therefore K_{\mp} = \frac{[\text{C}]^2}{[\text{A}][\text{B}]}$$

K_{\mp} 的量纲取决于体系中组分的数目.

严格说来, 所考虑的并非反应组分的浓度, 而是它们的活度或者说是有效浓度或表观浓度. 对于后面各章的大多数计算, 我们将假定 $\gamma=1$, 即活度等于摩尔浓度. 这一假定适用于生化研究用的一价和二价离子的稀水溶液. 附录 V 列出了一些活度系数.

例题 1-8

考虑反应 $\text{E} + \text{S} \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} \text{ES}$. 下列各系数的单位是什么? (a) k_1 , (b) k_{-1} 和 (c) K_{\mp} .

解:

$$(a) \quad v_f = k_1 [\text{E}][\text{S}]$$

令, v_f = 每分钟每升所形成的 ES 摩尔数

$$v_f = \text{摩尔数} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1} = M \times \text{分}^{-1}$$

而 $[\text{E}]$ 和 $[\text{S}] = \text{摩尔数} \times \text{升}^{-1} = M$

$$\therefore k_1 = \frac{v_f}{[\text{E}][\text{S}]} = \frac{M \times \text{分}^{-1}}{(M)^2} = \frac{\text{分}^{-1}}{M}$$

$$\text{或} \quad k_1 = \text{分}^{-1} \times M^{-1}$$

$$(b) \quad v_r = k_{-1}[\text{ES}]$$

$$k_{-1} = \frac{v_r}{[\text{ES}]} = \frac{M \times \text{分}^{-1}}{M} \quad \therefore k_{-1} = \text{分}^{-1}$$

$$(c) \quad K_{\mp} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{\text{分}^{-1} \times M^{-1}}{\text{分}^{-1}} \quad \therefore K_{\mp} = M^{-1}$$

$$\text{或} \quad K_{\mp} = \frac{[\text{ES}]}{[\text{E}][\text{S}]} = \frac{M}{(M)^2} = M^{-1}$$

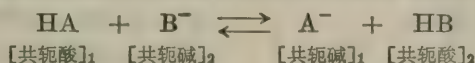
有关化学平衡的其它一些例题可在第三章找到.

C. 酸 和 碱

要想知道生物分子的特性, 必须了解酸-碱化学. 活细胞的许多低分子量代谢物和大分子组分都是酸和碱, 因而具有解离性. 这些分子所携带的电荷是决定下列诸方面的重要因素: 酶促反应速率、蛋白质稳定性和构象、大分子间及其与小离子的相互作用以及实验室中所用的分析和纯化技术.

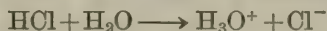
共轭酸-碱对的布朗斯特概念

普通生物化学中讨论酸和碱的最有效方法是把“酸”定义为供给质子(氢离子)的物质,并且把“碱”定义为接受质子的物质。这个概念一般叫做酸和碱的布朗斯特概念。当一个布朗斯特酸失去一个质子时,就有一个布朗斯特碱产生。原始的酸同生成的碱称为共轭酸-碱对。接受质子的物质是另一种布朗斯特碱;接受了这个质子以后就产生了另外一种布朗斯特酸。这样,酸或碱的每个解离作用都包含着两种共轭酸-碱对。

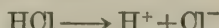


强酸和强碱的电离

“强”酸物质在水溶液中几乎 100% 地电离。例如,溶液中的 HCl 基本上 100% 地电离成 H_3O^+ 和 Cl^- :

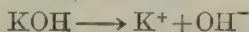


H_3O^+ (水合氢离子或水的共轭酸)是氢离子(质子)在溶液中的实际存在形式。HCl 的电离恰好可以简便地表示成一简单的解离作用:



因此,实际上 H_3O^+ 和 H^+ 指的是同一件事。视方便而定,我们将轮换地使用这两种“氢离子”的习惯表示法。

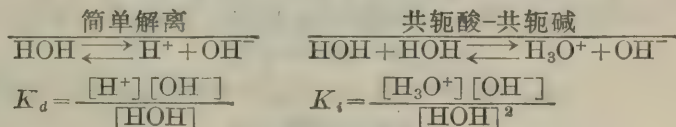
“强”碱物质在溶液中彻底电离成 OH^- 离子。氢氧化钠和氢氧化钾是无机强碱的两个例子。



水的电离

水本身的电离可以从两个方面考虑:(1)产生 H^+ 和 OH^- 离子的简单解离,和(2)通过布朗斯特酸-碱对电离。无论哪种情况,水显然是两性的:它既产生 H^+ 离子也产生 OH^- 离子;它既可以供给质子也可以接受质子。

水的电离可用水的“解离常数” K_d 、“电离常数” K_i 和水的特殊常数 K_w 描述,如下所示:



注意,水产生两种共轭酸-碱对: HOH/OH^- 和 $\text{H}_3\text{O}^+/\text{HOH}$ 。

对于每一摩尔 H^+ (或 H_3O^+),就有 1 摩尔 OH^- 产生。纯水的 $[\text{H}^+] = 10^{-7} M$, $\therefore [\text{OH}^-] = 10^{-7} M$ 。HOH 的摩尔浓度可计算如下:

$$M = \frac{\text{H}_2\text{O 的摩尔数}}{\text{升}} \quad \text{摩尔数} = \frac{\text{wt}_{\%}}{\text{MW}}$$

一升水重 1000 克,水的 MW 为 18。

$$\therefore M = \frac{1000 \text{ 克}/18 \text{ 克}}{1 \text{ 升}} = 55.6$$

水的摩尔浓度实际上是 55.6 M (原始浓度)减去 $10^{-7} M$ (电离水量)。但这个量非常接

近 55.6, 因而可以略去 $10^{-7} M$. 现在, 我们可以把上面的数值代入 K_d 和 K_i 表达式中.

$$\begin{array}{l|l} K_d = \frac{(10^{-7})(10^{-7})}{55.6} = \frac{10^{-14}}{55.6} & K_i = \frac{(10^{-7})(10^{-7})}{(55.6)^2} = \frac{10^{-14}}{3.09 \times 10^3} \\ K_d = 1.8 \times 10^{-16} & K_i = 3.24 \times 10^{-18} \end{array}$$

为多数生化问题所考虑的稀溶液中, 水的摩尔浓度基本为一常数. 所以, 我们可以把这两个常数结合起来(K_d 和 $[H_2O]$ 或 K_i 和 $[H_2O]^2$) 定义一个新的水的解离(或电离)常数 K_w .

$$\begin{array}{l|l} K_w = K_d \times [H_2O] & K_w = K_i \times [H_2O]^2 \\ K_w = (1.8 \times 10^{-16})(55.6) & K_w = (3.24 \times 10^{-18})(55.6)^2 \\ & = (3.24 \times 10^{-18})(3.09 \times 10^3) \\ K_w = 1 \times 10^{-14} = [H^+][OH^-] & K_w = 1 \times 10^{-14} = [H_3O^+][OH^-] \quad (20) \end{array}$$

pH 和 pOH

pH 是表示溶液中氢离子活度的简写. 根据定义, pH 是氢离子活度的负对数. 同样, pOH 是氢氧离子活度的负对数.

$$\begin{array}{l|l} \text{pH} = -\log a_{H^+} & \text{pOH} = -\log a_{OH^-} \\ = \log \frac{1}{a_{H^+}} & = \log \frac{1}{a_{OH^-}} \\ = -\log \gamma_{H^+} [H^+] & = -\log \gamma_{OH^-} [OH^-] \\ = \log \frac{1}{\gamma_{H^+} [H^+]} & = \log \frac{1}{\gamma_{OH^-} [OH^-]} \end{array}$$

在酸和碱的稀溶液中和在纯水中, H^+ 和 OH^- 的活度可以认为与它们的浓度相同.

$$\text{pH} = -\log [H^+] = \log \frac{1}{[H^+]} \quad \text{pOH} = -\log [OH^-] = \log \frac{1}{[OH^-]} \quad (21)$$

在一切水溶液中, 水的电离平衡必然得到满足, 即, $[H^+][OH^-] = K_w = 10^{-14}$. 因此, 若已知 $[H^+]$, 我们可以很容易算出 $[OH^-]$. 而且, 我们可以导出 pH 和 pOH 之间的下列关系:

$$[H^+][OH^-] = K_w$$

取对数,

$$\begin{aligned} \log [H^+] + \log [OH^-] &= \log K_w \\ -\log [H^+] - \log [OH^-] &= -\log K_w \\ -\log [H^+] = \text{pH} \quad -\log [OH^-] = \text{pOH} \quad -\log K_w = \text{p}K_w \\ \therefore \text{pH} + \text{pOH} &= \text{p}K_w \\ K_w = 10^{-14} \quad \text{p}K_w &= -\log 10^{-14} = +14 \\ \therefore \text{pH} + \text{pOH} &= 14 \quad (22) \end{aligned}$$

于是, 如果 $[H^+]$ 、 $[OH^-]$ 、pH 或 pOH 中任一数为已知, 其余三个数值则可很容易地计算出来. 当 H^+ 和 OH^- 的浓度大于 $0.1 M$ 时, 必须考虑活度系数.

例题 1-9

0.001 M HCl 溶液的下列数值是多少? (a) H^+ 离子浓度, (b) pH, (c) OH^- 离子浓度, 和 (d) pOH.

解:

(a) HCl 是无机“强”酸, 即它在稀溶液中基本上 100% 电离. 所以, 当把 0.001 摩尔 HCl 加

到 1 升水中时, 它立即解离成 $0.001 M$ 的 H^+ 和 $0.001 M$ 的 Cl^- .

注意, 当我们处理强酸时, 水的电离作用所产生的 H^+ 是忽略不计的.

<p>(b) $pH = -\log [H^+]$</p> <p style="margin-left: 40px;">$= -\log 10^{-3}$</p> <p style="margin-left: 40px;">$= -(-3) = +3$</p> <p>$pH = 3$</p>	或	<p>$pH = \log \frac{1}{[H^+]}$</p> <p style="margin-left: 40px;">$= \log \frac{1}{10^{-3}}$</p> <p style="margin-left: 40px;">$= \log 10^3$</p> <p>$pH = 3$</p>
<p>(c) $[H^+][OH^-] = K_w$</p> <p style="margin-left: 40px;">$[OH^-] = \frac{1 \times 10^{-14}}{1 \times 10^{-3}}$</p>		<p>$[OH^-] = \frac{K_w}{[H^+]}$</p> <p>$[OH^-] = 1 \times 10^{-11}$</p>
<p>(d) $pOH = -\log [OH^-]$</p> <p style="margin-left: 40px;">$= -\log (10^{-11})$</p> <p style="margin-left: 40px;">$= -(-11)$</p> <p>$pOH = 11$</p>	或	<p>$pOH = \log \frac{1}{[OH^-]}$</p> <p style="margin-left: 40px;">$= \log \frac{1}{10^{-11}}$</p> <p style="margin-left: 40px;">$= \log 10^{11}$</p> <p>$pOH = 11$</p>
<p>或</p> <p style="margin-left: 40px;">$pH + pOH = 14$</p> <p style="margin-left: 40px;">$pOH = 14 - 3$</p>		<p>$pOH = 14 - pH$</p> <p>$pOH = 11$</p>

例题 1-10

$0.002 M$ HNO_3 溶液的 (a) $[H^+]$, (b) $[OH^-]$, (c) pH , 和 (d) pOH 是多少?

解:

(a) HNO_3 是无机强酸

$$[H^+] = 0.002 M = 2 \times 10^{-3} M$$

(b) $[H^+][OH^-] = 1 \times 10^{-14}$

$$[OH^-] = \frac{1 \times 10^{-14}}{2 \times 10^{-3}} = 0.5 \times 10^{-11}$$

$$[OH^-] = 5 \times 10^{-12} M$$

<p>(c) $pH = \log \frac{1}{[H^+]}$</p> <p style="margin-left: 40px;">$= \log \frac{1}{2 \times 10^{-3}}$</p> <p style="margin-left: 40px;">$= \log 0.5 \times 10^3$</p> <p style="margin-left: 40px;">$= \log 5 \times 10^2$</p> <p style="margin-left: 40px;">$= \log 5 + \log 10^2$</p> <p style="margin-left: 40px;">$= 0.699 + 2$</p> <p>$pH = 2.699$</p>	或	<p>$pH = \log 500$</p> <p style="margin-left: 40px;">$\log 500 = 2.699$</p> <p>$pH = 2.699$</p>
---	---	---

式中, 2 是第一位有效数字和小数点之间的位数, 而 0.699 是“5”的对数.

验算:

$$10^{-2} M [H^+] = pH 2$$

$$10^{-3} M [H^+] = pH 3$$

<p>(d) $pH + pOH = 14$</p> <p>$pOH = 14.000 - 2.699$</p> <p>$pOH = 11.301$</p>	或	$pOH = \log \frac{1}{[OH^-]}$ $= \log \frac{1}{5 \times 10^{-12}}$ $= \log 0.2 \times 10^{12}$ $= \log 2 \times 10^{11}$ $= \log 2 + \log 10^{11}$ $= 0.301 + 11$ <p style="text-align: right;">$pOH = 11.301$</p>
---	---	---

解：

$$\text{pH} = \log \frac{1}{[\text{H}^+]} = 3.4$$
 或

$$[\text{H}^+] = 10^{-\text{pH}}$$

$$= 10^{-3.4}$$

$$= 10^{-4} \times 10^{+0.6}$$

是第一位有效数字和小数点之间的
 “4”的反对数

$$\text{antilog } 4 = "2512"$$

$$\therefore [\text{H}^+] = \frac{1}{2512}$$

$$= \frac{1}{2.512 \times 10^3}$$

$$= 0.398 \times 10^{-3}$$

$$[\text{H}^+] = 3.98 \times 10^{-4} M$$

查 0.6 的反对数

$$\text{antilog } 0.6 = "398"$$

$$= 3.98$$

$$[\text{H}^+] = 3.98 \times 10^{-4} M$$

查 0.6 的反对数

$$\begin{aligned}\text{antilog } 0.6 &= "398" \\ &= 3.98 \\ [\text{H}^+] &= 3.98 \times 10^{-4} M\end{aligned}$$

验算:

$$\begin{aligned} \therefore \text{HNO}_3 &= 3.98 \times 10^{-4} \text{ M (假设 100\% 电离)} \\ \text{pH } 3 &= 10^{-3} \text{ M } [\text{HNO}_3] \\ \text{pH } 4 &= 10^{-4} \text{ M } [\text{HNO}_3] \\ \therefore \text{pH } 3.4 &= 10^{-4} \text{ M 和 } 10^{-3} \text{ M 之间的 } [\text{HNO}_3] \end{aligned}$$

解:

(a) $\text{pH} = 3$
 $\therefore [\text{H}^+] = 10^{-3} \text{ M} (10^{-3} \text{ 克离子/升})$
 $1 \text{ 克离子/升} = 6.023 \times 10^{23} \text{ 离子/升}$
 $\therefore 10^{-3} \text{ 克离子/升} = 6.023 \times 10^{20} \text{ 离子/升}$
 $\therefore \frac{6.023 \times 10^{20}}{4} = 1.506 \times 10^{20} \text{ 离子/250 毫升}$

(b) $\text{pH} + \text{pOH} = 14$

$$\text{pOH} = 14 - 3 = 11$$

$$[\text{OH}^-] = 10^{-11} M \text{ 或 } 10^{-11} \text{ 克离子/升}$$

$$10^{-11} \text{ 克离子/升} \times 6.023 \times 10^{23} \text{ 离子/克离子} = 6.023 \times 10^{12} \text{ 离子/升}$$

$$\frac{6.023 \times 10^{12}}{4} = 1.506 \times 10^{13} \text{ 离子/250 毫升}$$

例题 1-13

$10^{-8} M$ HCl 溶液的 pH 是多少?

解:

许多学生首先要说“ $\text{pH} = 8$ ”，这显然是错误的。对于强酸，无论怎样稀释，该溶液永远不会变成碱性。在这个稀溶液中，水电离产生的 H^+ 离子数量实际上大于 HCl 解离所产生的 H^+ 离子数量。所以，做为一级近似，由 HCl 解离所产生的 H^+ 离子可略去不计。于是 pH 约为 7。

当考虑 H^+ 离子有两种来源时，我们可用二级近似，求解 pH。

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

$$[\text{H}^+] = 10^{-7} (\text{来自 } \text{H}_2\text{O}) + 10^{-8} (\text{来自 HCl})$$

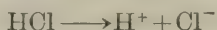
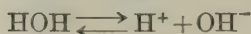
$$\text{pH} = -\log (1 \times 10^{-7} + 0.1 \times 10^{-7})$$

$$= \log \frac{1}{1.1 \times 10^{-7}} = \log 0.909 \times 10^7 = \log 9.09 \times 10^6$$

$$= \log 9.09 + \log 10^6 = 0.959 + 6$$

$$\text{pH} = 6.959$$

上面的解法仍不完全正确，因为在有 $10^{-8} M$ HCl 的情况下，来自水的 H^+ 离子浓度仍假定是 $10^{-7} M$ 。实际上，来自 HCl 的少量 H^+ 离子有降低 H_2O 电离作用的趋向，即，使 $\text{HOH} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{OH}^-$ 的平衡退回左边。该题的正确求解可按下法进行：HOH 和 HCl 均电离，形成 H^+ 离子。



令 X 为来自水的 $[\text{H}^+]$

$$\therefore [\text{OH}^-] = X$$

$$\text{来自 HCl 的 } [\text{H}^+] = 10^{-8} M$$

$$\therefore [\text{H}^+] = X + 10^{-8}, [\text{OH}^-] = X$$

$$[\text{H}^+][\text{OH}^-] = 10^{-14}$$

$$(X + 10^{-8})(X) = 10^{-14}$$

$$X^2 + 10^{-8}X = 10^{-14}$$

$$X^2 + 10^{-8}X - 10^{-14} = 0$$

上述方程可以代入二次方程的一般求解公式求出：

$$X = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

式中， $a=1$ ， $b=10^{-8}$ ， $c=-10^{-14}$ 。

$$\begin{aligned}
 X &= \frac{-10^{-8} \pm \sqrt{(10^{-8})^2 - 4(-10^{-14})}}{2} = \frac{-10^{-8} \pm \sqrt{10^{-16} + 4 \times 10^{-14}}}{2} \\
 &= \frac{-10^{-8} \pm \sqrt{4.01 \times 10^{-14}}}{2} = \frac{-10^{-8} \pm 2.0025 \times 10^{-7}}{2} \\
 &= \frac{-10^{-8} \pm 20.025 \times 10^{-8}}{2} \\
 &= \frac{19.025 \times 10^{-8}}{2} \text{ 和 } \frac{-21.025 \times 10^{-8}}{2}
 \end{aligned}$$

$$X = 9.5125 \times 10^{-8} \text{ (舍去负值)}$$

$$[\text{H}^+] = X + 10^{-8}$$

$$= 9.5125 \times 10^{-8} + 10^{-8} = 10.5125 \times 10^{-8}$$

$$\text{pH} = \log \frac{1}{10.5125 \times 10^{-8}} = \log 0.09512 \times 10^8 = \log 9.512 \times 10^6$$

$$= \log 9.512 + \log 10^6 = 0.978 + 6$$

$$\text{pH} = 6.978$$

例题 1-14

0.010 M HNO_3 溶液的 (a) a_{H^+} , 和 (b) γ_{H^+} 是多少? 设该溶液的 pH 为 2.08.

解:

在这个问题中, 我们不能再假定 $a_{\text{H}^+} = [\text{H}^+]$. 显然, 如果 $a_{\text{H}^+} = [\text{H}^+]$ 和 $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$, 则 pH 应是 2.0, 而不是 2.08. $\therefore \gamma \neq 1$.

$$(a) \quad \text{pH} = \log \frac{1}{a_{\text{H}^+}}$$

$$2.08 = \log \frac{1}{a_{\text{H}^+}}$$

$$\text{antilog } 2.08^* = "120"$$

$$\frac{1}{a_{\text{H}^+}} = 120$$

$$a_{\text{H}^+} = \frac{1}{120}$$

$$a_{\text{H}^+} = 0.0083$$

$$a_{\text{H}^+} = 8.3 \times 10^{-3}$$

或

$$a_{\text{H}^+} = 10^{-\text{pH}}$$

$$a_{\text{H}^+} = 10^{-2.08}$$

$$= 10^{-3} \times 10^{+0.92}$$

$$= 10^{-3} \times 8.3$$

$$a_{\text{H}^+} = 8.3 \times 10^{-3}$$

(b)

$$a_{\text{H}^+} = \gamma_{\text{H}^+} [\text{H}^+] \quad \text{式中, } \gamma = \text{活度系数}$$

$$0.0083 = \gamma_{\text{H}^+} (0.010)$$

$$\gamma_{\text{H}^+} = 0.83$$

虽然 HNO_3 的实际浓度是 0.01 M, 但溶液表现出好象仅有 83% 的 HNO_3 解离. 其有效浓度或表观浓度 (a_{H^+}) 是 0.0083 M. 实际上, HNO_3 是 100% 电离的, 但离子间的相互作用阻碍了 H^+ 离子的充分表现, 即, H^+ 离子周围的 NO_3^- 离子的屏蔽效应使之看起来似乎有些 H^+ 离子并不在那里.

* 原文误为 0.08, 应为 2.08——译者注.

强酸和强碱的中和及滴定

例题 1-15

(a) 恰好中和 525 毫升 0.06 M KOH 需要 0.025 M H_2SO_4 多少毫升? (b) “被中和”溶液的 pH 是多少?

解:

(a) 所需 H^+ 的摩尔(当量)数 = 存在的 OH^- 的摩尔(当量)数

$$\text{体积(升)} \times N = \text{当量数}$$

$$\text{体积(升)}_{\text{酸}} \times N_{\text{酸}} = \text{体积(升)}_{\text{碱}} \times N_{\text{碱}}$$

$$\text{H}_2\text{SO}_4 = 0.025 \text{ M} = 0.05 \text{ N}$$

$$\text{体积(升)}_{\text{酸}} \times 0.05 = 0.525 \times 0.06$$

$$\text{体积(升)}_{\text{酸}} = \frac{0.525 \times 0.06}{0.05} = 0.63$$

所需酸 = 630 毫升

(b) 此被中和的溶液只含 K_2SO_4 , 由于它是强酸强碱的盐, 对 pH 无影响。

$$\therefore \text{pH} = 7$$

例题 1-16

恰好中和 8.0 克 NaOH 需 0.05 N HCl 多少毫升?

解:

在等当量点, 加入的 H^+ 摩尔数等于所存在的 OH^- 摩尔数。

$$\text{体积(升)}_{\text{酸}} \times N_{\text{酸}} = \text{加入的 } \text{H}^+ \text{ 摩尔(当量)数}$$

$$\frac{\text{wt}_{\text{NaOH}}}{\text{MW}_{\text{NaOH}}} = \text{所存在的 NaOH (和 } \text{OH}^- \text{) 摩尔数}$$

$$\text{体积(升)} \times N = \frac{\text{wt}_{\text{NaOH}}}{\text{MW}_{\text{NaOH}}} \quad \text{体积(升)} \times 0.05 = \frac{8.0}{40}$$

$$\text{体积(升)} = \frac{8.0}{40 \times 0.05} = \frac{8.0}{2} = 4.0 \text{ 升} = 4000 \text{ 毫升}$$

例题 1-17

用 0.01 N KOH 滴定 500 毫升 0.01 N HCl, 计算其相应数值并绘出其滴定曲线。

解:

滴定曲线是 pH 对所加入的标准滴定剂毫升数(或当量数或摩尔数)作图的曲线。对于滴定一定量的酸, 其滴定曲线就是 pH 对所加入碱的毫升数(或当量数)作图的曲线。在达到等当量点以前, 任何一点的 pH 可以从剩余的过量(未被滴定的) H^+ 浓度算出(考虑体积增量)。在等当量点, 溶液只含 KCl, 此强酸强碱的盐对该溶液的 pH 无影响, 因此 $\text{pH} = 7.0$ 。超过等当量点的 pH 可以从过量的 OH^- 浓度算出。滴定曲线如图 1-1 所示。

弱酸的电离

在水溶液中, 弱酸进行有限地电离, 如下所示:



[共轭酸]₁ [共轭碱]₂ [共轭酸]₂ [共轭碱]₁

水接受 HA 所放出来的质子形成水合氢离子 H_3O^+ 。这个可逆的电离反应可用平衡常数 K_i 描述:

$$K_i = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}][\text{H}_2\text{O}]}$$

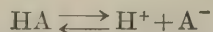
由于 $[\text{H}_2\text{O}]$ 本身为一常数, 我们可以合并 K_i 和 $[\text{H}_2\text{O}]$ 从而定义一个新的常数 K_a 。

$$K_i [\text{H}_2\text{O}] = K_a = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

由于 $[\text{H}_3\text{O}^+]$ 与“氢离子浓度” $[\text{H}^+]$ 是一样的, K_a 表达式通常书写如下:

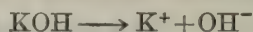
$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

如果假定这个弱酸直接解离成 H^+ 和 A^- , 那么, 上面的 K_a 表达式与我们所求得的表达式相同是不足为奇的。



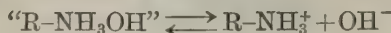
弱碱的电离

在水溶液中, 无机碱通过解离作用直接产生 OH^- 离子。



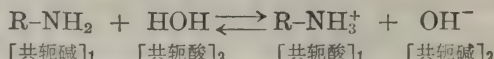
有机碱, 如胺类 R-NH_2 , 不含供解离用的 OH 。但是, 如果假设 R-NH_2 与 H_2O 反应形成

“ $\text{R-NH}_3\text{OH}$ ”, 则可以认为有机碱的“解离作用”直接产生 OH^- , 正如我们对无机碱所认为的那样。事实上, 我们考虑氨水, NH_3 时是经常这样做的; 我们假定所存在的这个可解离的物质是“ NH_4OH ”。



我们应当记住, “ $\text{R-NH}_3\text{OH}$ ” 指的是 R-NH_2 与任何可能存在的少量 $\text{R-NH}_3\text{OH}$ 的总和。

无论是把酸的电离作用看成是简单的解离作用, 或者看成是有水做为共轭碱参加真正的电离作用, 通常是无关紧要的。但是在处理有机碱时, 考虑其实际存在的电离情况, 往往更为有利。



[共轭碱]₁ [共轭酸]₂ [共轭酸]₁ [共轭碱]₂

所涉及的两个共轭酸-碱对是 $\text{R-NH}_3^+/\text{R-NH}_2$ 和 HOH/OH^- 。该电离可用电离常数 K_i 描述。

$$K_i = \frac{[\text{R-NH}_3^+][\text{OH}^-]}{[\text{R-NH}_2][\text{H}_2\text{O}]}$$

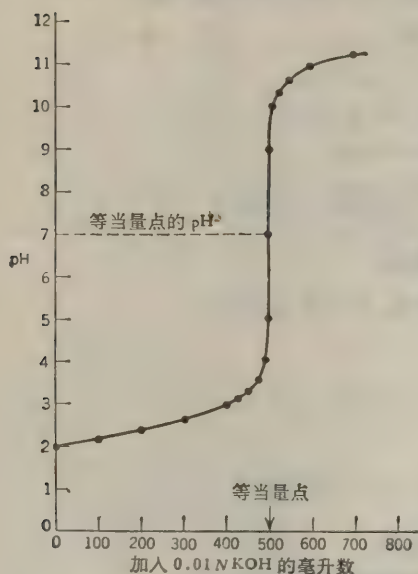


图 1-1 用强碱(如 KOH)滴定强酸(如 HCl)。

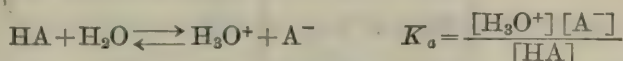
我们又可以合并 K_i 和 $[\text{H}_2\text{O}]$ 从而定义一个新的常数 K_b 。

$$K_i[\text{H}_2\text{O}] = K_b = \frac{[\text{R-NH}_3^+][\text{OH}^-]}{[\text{R-NH}_2]}$$

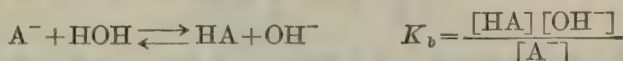
如果我们假定 R-NH_2 实际上是 $\text{R-NH}_3\text{OH}$ 并直接解离成 R-NH_3^+ 和 OH^- ，则该 K_b 表达式恰好与我们所得到的相同。

弱酸和弱碱的 K_a 和 K_b 之间的关系

当弱酸 HA 溶于水时，它就如以前所示的进行电离，形成 H_3O^+ 和相应的共轭碱 A^- 。对于此电离作用，可以写出 K_a 表达式。



如果从这个共轭碱 A^- 出发，并把它溶于水中，它即做为一典型的碱进行电离：接受 H_2O 的一个质子形成 OH^- 和相应的共轭酸 HA 。对于此电离作用，可以写出 K_b 表达式。



从 K_a 和 K_b 表达式求解 $[\text{H}_3\text{O}^+]$ 和 $[\text{OH}^-]$ ：

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = \frac{[\text{HA}]K_a}{[\text{A}^-]} \quad [\text{OH}^-] = \frac{[\text{A}^-]K_b}{[\text{HA}]}$$

代入 $[\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-] = K_w$ 中，

$$\frac{[\text{HA}]K_a}{[\text{A}^-]} \times \frac{[\text{A}^-]K_b}{[\text{HA}]} = K_w$$

或

$$K_a \times K_b = K_w \quad (23)$$

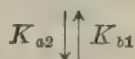
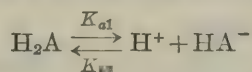
取对数：

$$\begin{aligned} \log K_a + \log K_b &= \log K_w \\ -\log K_a - \log K_b &= -\log K_w \end{aligned}$$

正如将 $-\log [\text{H}^+]$ 定义为 pH 一样，我们可以将 $-\log K_a$ 定义为 $\text{p}K_a$ ，将 $-\log K_b$ 定义为 $\text{p}K_b$ 和将 $-\log K_w$ 定义为 $\text{p}K_w$ (等于 14)

$$\therefore \text{p}K_a + \text{p}K_b = 14 \quad (23a)$$

多元酸的 K_a 值是按酸强度降低的顺序编号的 (K_{a1} , K_{a2} , 等)， K_b 值则按碱强度降低的顺序编号。但要记住，最强酸类的共轭碱是最弱的碱，反之亦然。所以， K_a 和 K_b 值的编号如下所示。



使用 K_a 和 K_b (或 $\text{p}K_a$ 和 $\text{p}K_b$) 时，必须确知是属于同一电离作用。对于上述二元酸，正确的表达式如下：

$$\begin{aligned} K_{a1} \times K_{b2} &= K_w & \text{p}K_{a1} + \text{p}K_{b2} &= \text{p}K_w \\ K_{a2} \times K_{b1} &= K_w & \text{p}K_{a2} + \text{p}K_{b1} &= \text{p}K_w \end{aligned}$$

弱酸溶液的 pH

弱的一元酸(HA)的解离, 产生同样浓度的 H^+ 和 A^- 。如果 K_a 和 HA 的原始浓度为已知, 则 H^+ 的浓度很容易计算:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = \frac{[H^+]^2}{[HA]}$$

$$[H^+] = \sqrt{K_a [HA]} \quad (24)$$

方程式 (24) 假设电离度很小, 因而 $[HA]$ 基本保持不变。为了得到 pH 表达式, 我们将上述方程式取对数:

$$\log [H^+] = \frac{1}{2} \log K_a [HA] = \frac{1}{2} (\log K_a + \log [HA])$$

$$-\log [H^+] = \frac{-\log K_a - \log [HA]}{2}$$

或
$$pH = \frac{pK_a + p[HA]}{2} \quad (25)$$

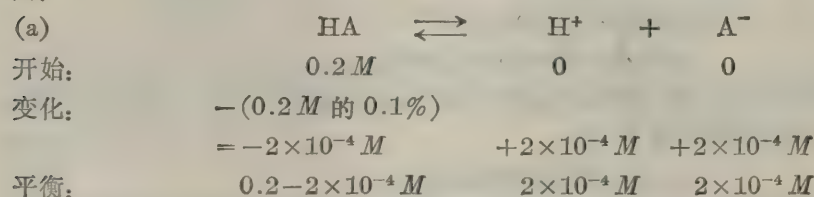
式中, $p[HA]$ 是 HA 浓度的负对数。对于弱碱(A^- 或 RNH_2)可导出类似关系。

$$[OH^-] = \sqrt{K_b [A^-]} \quad \text{和} \quad pOH = \frac{pK_b + p[A^-]}{2} \quad (26)$$

例题 1-18

弱酸 HA 在 0.2 M 溶液中有 0.1% 电离(解离)。(a) 该酸解离的平衡常数(K_a)是多少? (b) 该溶液的 pH 是多少? (c) HA 溶液的有效酸度比 0.2 M HCl 溶液“弱”多少? (d) 完全中和 500 毫升 0.2 M HA 溶液需多少毫升 0.1 N KOH?

解:



$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = \frac{(2 \times 10^{-4})(2 \times 10^{-4})}{0.2 - 2 \times 10^{-4}}$$

如果 HA 的解离量与原始 HA 的浓度比较起来是很小的话(如 10% 或更小), 则分母中的减数可忽略不计, 从而简化了 K_a 表达式。

$$K_a = \frac{(2 \times 10^{-4})(2 \times 10^{-4})}{0.2} = \frac{4 \times 10^{-8}}{2 \times 10^{-1}}$$

$$K_a = 2 \times 10^{-7}$$

(b)
$$pH = \log \frac{1}{[H^+]} = \log \frac{1}{2 \times 10^{-4}} = \log 0.5 \times 10^4 = \log 5 \times 10^3$$

$$= \log 5 + \log 10^3 = 0.7 + 3$$

$$pH = 3.7$$

(c) 0.2 M 的 HCl 溶液理应 100% 地电离并产生 0.2 M H^+ 。

$$\text{pH} = \log \frac{1}{[\text{H}^+]} = \log \frac{1}{2 \times 10^{-1}} = \log 0.5 \times 10^1 = \log 5$$

$$\text{pH} = 0.7 \quad (\text{假定 } \gamma = 1)$$

∴ 该弱酸的酸度比 0.2 M HCl 溶液小 3 pH 单位。记住, pH 标度是对数标度而不是线性标度。所以, 此 HA 的酸度比 HCl 少 10^3 或 1000 倍(不是 3 倍)。

(d) 尽管该弱酸的有效酸度 $[\text{H}^+]$ 比 HCl 溶液少 1000 倍, 但总酸度(自由 H^+ 加 HA 中未解离的氢)是相同的。当加入 OH^- 时, 它与自由 H^+ 反应形成 H_2O 。而后某些 HA 随即解离成 H^+ 和 A^- 以重新建立平衡。这种 H^+ 同样为再加入的 OH^- 所中和, 如此进行到全部 HA 均被中和为止。因此, 弱酸的中和计算同强酸是一样的。

所需 OH^- 摩尔数 = 可用 H^+ 的摩尔总数

$$\text{体积(升)}_{\text{碱}} \times N_{\text{碱}} = \text{体积(升)}_{\text{酸}} \times N_{\text{酸}}$$

HA 是一元酸,

$$\therefore N = M$$

$$\text{体积(升)}_{\text{碱}} \times 0.1 = 0.5 \times 0.2$$

$$\text{体积(升)}_{\text{碱}} = \frac{0.5 \times 0.2}{0.1} = \frac{0.1}{0.1} = \text{需要 1 升碱}$$

例题 1-19

HA 为一弱酸, 其 K_a 为 1.6×10^{-6} 。(a) 其 pH 是多少? (b) 该酸为 $10^{-3} M$ 溶液时的电离度是多少? (c) 计算 $\text{p}K_a$ 和 $\text{p}K_b$ 。

解:

(a) 令 x 是解离 HA 的 M 。∴ x 等于生成 H^+ 的 M 也是生成 A^- 的 M 。

	HA	\rightleftharpoons	H ⁺	+	A ⁻
开始:	$10^{-3} M$		0		0
变化:	$-x M$		$+x M$		$+x M$
平衡:	$10^{-3} - x M$		$x M$		$x M$

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = \frac{(x)(x)}{10^{-3} - x} = 1.6 \times 10^{-6}$$

首先计算 x , 假定 x 比未解离酸的浓度小得多, 即假定该酸的电离少于 10%。于是 K_a 表达式的分母可以化简。

$$1.6 \times 10^{-6} = \frac{x^2}{10^{-3}}$$

$$x^2 = 1.6 \times 10^{-9} = 16 \times 10^{-10}$$

$$x = \sqrt{16 \times 10^{-10}} = \sqrt{16} \times \sqrt{10^{-10}} = 4.0 \times 10^{-5}$$

$$[\text{H}^+] = 4 \times 10^{-5} M$$

或利用方程式 (24):

$$\begin{aligned} [\text{H}^+] &= \sqrt{K_a [\text{HA}]} = \sqrt{(1.6 \times 10^{-6})(10^{-3})} \\ &= \sqrt{16 \times 10^{-10}} = 4 \times 10^{-5} M \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{pH} &= \log \frac{1}{[\text{H}^+]} \\
 &= \log \frac{1}{4 \times 10^{-5}} = \log 0.25 \times 10^5 = \log 2.5 \times 10^4 \\
 &= \log 2.5 + \log 10^4 = 0.398 + 4 \\
 \text{pH} &= \mathbf{4.398}
 \end{aligned}$$

(b)

$$\begin{aligned}
 \text{电离度} &= \frac{[\text{H}^+]}{[\text{HA}]_{\text{始}}} \times 100 \\
 &= \frac{4 \times 10^{-5}}{10^{-3}} \times 100 = \frac{4 \times 10^{-3}}{10^{-3}} = \mathbf{4\%}
 \end{aligned}$$

该酸电离确实少于 10%，所以简化 K_a 表达式的分母项是合理的。

(c) $\text{p}K_a$ 是 K_a 的负对数。

$$\begin{aligned}
 \text{p}K_a &= -\log K_a = \log \frac{1}{K_a} \\
 \text{p}K_a &= \log \frac{1}{1.6 \times 10^{-6}} = \log 6.25 \times 10^5 \\
 \text{p}K_a &= \log 6.25 + \log 10^5 = 0.796 + 5 \\
 \text{p}K_a &= \mathbf{5.796} \\
 \text{p}K_a + \text{p}K_b &= 14 \quad \text{p}K_b = 14 - \text{p}K_a = 14 - 5.796 \\
 \text{p}K_b &= \mathbf{8.204}
 \end{aligned}$$

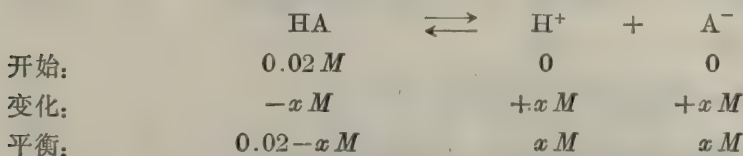
例题 1-20

计算(a)在中等强度($K_a = 3 \times 10^{-2} M$) 0.02 M 酸(HA)溶液中的 H^+ 离子浓度, 和(b)该酸的解离度。

解:

(a) 令

x 为解离 HA 的浓度 M = 所生成的 H^+ 的 M



$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad 3 \times 10^{-2} = \frac{(x)(x)}{0.02 - x}$$

K_a 较大($>10^{-3}$)表明该酸解离大于 10%，故 K_a 表达式的分母项不应化简。

$$\begin{aligned}
 (3 \times 10^{-2})(0.02 - x) &= x^2 \\
 6 \times 10^{-4} - 3 \times 10^{-2}x &= x^2 \\
 x^2 + 3 \times 10^{-2}x - 6 \times 10^{-4} &= 0
 \end{aligned}$$

利用二次方程的通解求 x ,

$$x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

式中, $a=1$, $b=3 \times 10^{-2}$, $c=-6 \times 10^{-4}$ 。

$$\begin{aligned}
 x &= \frac{-3 \times 10^{-2} \pm \sqrt{(3 \times 10^{-2})^2 - 4(-6 \times 10^{-4})}}{2} \\
 &= \frac{-3 \times 10^{-2} \pm \sqrt{(9 \times 10^{-4}) + 24 \times 10^{-4}}}{2} \\
 &= \frac{-3 \times 10^{-2} \pm \sqrt{33 \times 10^{-4}}}{2} = \frac{-3 \times 10^{-2} \pm 5.74 \times 10^{-2}}{2} \\
 &= \frac{+2.74 \times 10^{-2}}{2} \text{ (舍去负解)}
 \end{aligned}$$

$$[\text{H}^+] = 1.37 \times 10^{-2} \text{ M}$$

(b)

$$\begin{aligned}
 \text{解离度} &= \frac{[\text{H}^+]}{[\text{HA}]_{\text{始}}} \times 100 \\
 &= \frac{0.0137}{0.0200} \times 100 = 68.5\%
 \end{aligned}$$

例题 1-21

$\text{p}K_{\text{a}}$ 为 9.6 的胺, 其 $3.5 \times 10^{-2} \text{ M}$ 溶液的 pH 是多少?

解:

$$\begin{array}{l|l}
 \text{p}K_{\text{b}} = \text{p}K_{\text{w}} - \text{p}K_{\text{a}} & \text{p}[\text{RNH}_2] = -\log [\text{RNH}_2] \\
 = 14 - 9.6 & = \log \frac{1}{3.5 \times 10^{-2}} \\
 \text{p}K_{\text{b}} = 4.4 & = \log 28.57 \\
 & \text{p}[\text{RNH}_2] = 1.456 \\
 \text{pOH} = \frac{\text{p}K_{\text{b}} + \text{p}[\text{RNH}_2]}{2} = \frac{4.4 + 1.456}{2} = \frac{5.86}{2} = 2.93 & \\
 \text{pH} = 14 - \text{pOH} = 14 - 2.93 & \\
 \text{pH} = 11.07 &
 \end{array}$$

例题 1-22

计算 0.1 M 丁酸溶液的离子强度, $K_{\text{a}} = 1.5 \times 10^{-5}$.

解:

丁酸仅部分电离, 未解离分子对该溶液的离子强度无影响. 首先计算 M_{H^+} 和 $M_{\text{丁酸根}^-}$

$$K_{\text{a}} = \frac{[\text{H}^+][\text{丁酸根}^-]}{[\text{丁酸}]} = \frac{(X)(X)}{0.1 - X} = \frac{X^2}{0.1} = 1.5 \times 10^{-5}$$

$$X^2 = 1.5 \times 10^{-6}$$

$$X = \sqrt{150 \times 10^{-8}} = 12.25 \times 10^{-4}$$

$$[\text{H}^+] = 1.225 \times 10^{-3} \text{ M}, \quad [\text{丁酸根}^-] = 1.225 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$\begin{aligned}
 \frac{I}{2} &= \frac{1}{2} \sum M_i Z_i^2 = \frac{1}{2} [M_{\text{H}^+} Z_{\text{H}^+}^2 + M_{\text{丁酸根}^-} Z_{\text{丁酸根}^-}^2] \\
 &= \frac{(1.225 \times 10^{-3})(1)^2 + (1.225 \times 10^{-3})(-1)^2}{2}
 \end{aligned}$$

$$\frac{I}{2} = 1.225 \times 10^{-3}$$

浓度对解离度的影响

根据质量作用定律,弱酸的解离度随浓度而变化。 $\text{HA} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{A}^-$ 型的解离体系,平衡式两侧的质点数不等。当全部质点的总浓度增加时,平衡向左移动(即向质点较少的一侧移动);当全部质点的总浓度降低时,平衡向右移动(即向质点数目较多的一侧移动)。其平衡常数保持恒定,仅各种质点的相对比例发生变化。

举一简单例子可说明,如果要使 $K_{\text{平}}$ 保持恒定,在稀释时必须改变相对比例。今有反应 $\text{A} \rightleftharpoons \text{B} + \text{C}$ 。平衡时, A、B 和 C 的浓度关系可由下式表示:

$$K_{\text{平}} = \frac{[\text{B}][\text{C}]}{[\text{A}]} = 1.0$$

令字母 A、B 和 C 代表某种平衡浓度,例如 1 M。现将该溶液稀释十倍,如果 A、B 和 C 的相对比例保持恒定:

$$\text{A 的新浓度} = 0.1[\text{A}] = 0.1 \text{ M}$$

$$\text{B 的新浓度} = 0.1[\text{B}] = 0.1 \text{ M}$$

$$\text{C 的新浓度} = 0.1[\text{C}] = 0.1 \text{ M}$$

但

$$\frac{(0.1)(0.1)}{0.1} \neq 1.0$$

所以,要重新建立平衡,必须改变相对浓度。B 和 C 增大,同时 A 变小。

浓度 K_{a} 和解离度之间的数学关系很容易推导。

	HA	\rightleftharpoons	H^+	+	A^-
开始:	C		0		0
变化:	$-nC$		$+nC$		$+nC$
平衡:	$C - nC$		nC		nC

这里, $C = \text{HA}$ 的原始总浓度,

$n =$ 以小数表示的解离分数。

$$K_{\text{a}} = \frac{(nC)(nC)}{(C - nC)} \quad K_{\text{a}}C - K_{\text{a}}nC = n^2C^2$$

$$K_{\text{a}} - K_{\text{a}}n = n^2C \quad K_{\text{a}}(1 - n) = n^2C$$

$$C = \frac{1 - n}{n^2} K_{\text{a}} \quad (27)$$

如果 nC 与 C 比较起来很小,则 K_{a} 表达式可简化成

$$K_{\text{a}} = \frac{(nC)(nC)}{C} = \frac{n^2C^2}{C} = n^2C$$

解 C 或 n :

$$C = \frac{K_{\text{a}}}{n^2} \quad \text{和} \quad n = \sqrt{\frac{K_{\text{a}}}{C}} \quad (28)$$

例题 1-23

HA 为一弱酸,在何种浓度(以 K_{a} 来表示)(a) 该酸将解离 10%, (b) 解离 50%, 和 (c) 解离 90%?

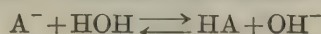
解:

$$\begin{aligned}
 \text{(a)} \quad C &= \frac{1-n}{n^2} K_a = \frac{1-0.1}{(0.1)^2} K_a = \frac{0.9}{0.01} K_a & C &= 90 K_a \\
 \text{(b)} \quad C &= \frac{1-0.5}{(0.5)^2} K_a = \frac{0.5}{0.25} K_a & C &= 2 K_a \\
 \text{(c)} \quad C &= \frac{1-0.9}{(0.9)^2} K_a = \frac{0.1}{0.81} K_a & C &= 0.123 K_a
 \end{aligned}$$

于是, 我们看到, 解离度随 HA 的原始浓度的降低而增大。

弱酸盐和弱碱盐的“水解”

弱酸盐(弱酸的共轭碱阴离子)与水反应产生母体弱酸(共轭酸)和 OH^- 离子。



我们可以看到, 此“水解”无非是前面所叙述过的共轭碱的电离。“水解常数” K_h 同于 K_b 。

$$K_{\mp} = \frac{[\text{HA}][\text{OH}^-]}{[\text{A}^-][\text{HOH}]} \quad K_{\mp}[\text{HOH}] = K_h = \frac{[\text{HA}][\text{OH}^-]}{[\text{A}^-]} = K_b$$

同样, 弱碱盐(弱碱的共轭酸)与水反应产生母体弱碱和 H^+ 离子。



或 $\text{NH}_4^+ + \text{HOH} \rightleftharpoons \text{“NH}_4\text{OH”} + \text{H}^+$

我们再次看到此“水解”无非是共轭酸的一般电离。在这种情况下, 所定义的 K_h 同于该共轭酸的 K_a 。

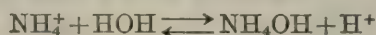
$$K_{\mp} = \frac{[\text{R-NH}_2][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{R-NH}_3^+][\text{HOH}]} \quad K_{\mp}[\text{HOH}] = K_h = \frac{[\text{R-NH}_2][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{R-NH}_3^+]} = K_a$$

例题 1-24

(a) 计算 0.1 M NH_4Cl 溶液的 pH, NH_4OH 的 K_b 值为 1.8×10^{-5} 。(b) 该盐的水解度是多少?

解:

(a) NH_4Cl 是强酸弱碱盐。所以, 由于 NH_4^+ 离子的水解, NH_4Cl 溶液将呈酸性。



$$K_h = K_a = \frac{K_w}{K_b} = \frac{1 \times 10^{-14}}{1.8 \times 10^{-5}} = 5.56 \times 10^{-10}$$

$$K_h = \frac{[\text{NH}_4\text{OH}][\text{H}^+]}{[\text{NH}_4^+]} = 5.56 \times 10^{-10}$$

令

y = 水解时所产生的 NH_4OH 的 M

$\therefore y$ = 水解时所产生的 H^+ 的 M

$$\frac{(y)(y)}{(0.1-y)} = 5.56 \times 10^{-10}$$

化简后:

$$y^2 = 5.56 \times 10^{-11} \quad y = \sqrt{5.56} \times \sqrt{10^{-12}}$$

$$[\text{H}^+] = 7.46 \times 10^{-6} \quad \text{pH} = \log \frac{1}{7.46 \times 10^{-6}}$$

$$\text{pH} = 5.13$$

$$\begin{aligned}
 \text{(b)} \quad \text{水解度} &= \frac{[\text{H}^+]}{[\text{NH}_4^+]} \times 100\% = \frac{7.46 \times 10^{-6}}{10^{-1}} \times 100 \\
 &= \frac{7.46 \times 10^{-4}}{10^{-1}} = 7.46 \times 10^{-3}\%
 \end{aligned}$$

由于 NH_4^+ 的水解(电离)少于 10%, 用 0.1 M 代替 0.1-y M 是合理的。

Henderson-Hasselbalch 方程

我们可以导出一个有用的表达式, 从而建立起(a)弱酸 HA 的 K_a 和弱酸溶液的 pH, 或(b)弱碱的 K_b 和弱碱溶液的 pOH 之间的关系。

$$\text{(a)} \quad K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

$$\text{重排各项:} \quad [\text{H}^+] = K_a \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

$$\text{两边取对数:} \quad \log [\text{H}^+] = \log K_a + \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

$$\text{两边乘以 } -1: \quad -\log [\text{H}^+] = -\log K_a - \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

$$\text{pH} = \text{p}K_a - \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (29)$$

$$\text{(b)} \quad K_b = \frac{[\text{M}^+][\text{OH}^-]}{[\text{MOH}]}$$

$$[\text{OH}^-] = K_b \frac{[\text{MOH}]}{[\text{M}^+]}$$

$$\log [\text{OH}^-] = \log K_b + \log \frac{[\text{MOH}]}{[\text{M}^+]}$$

$$-\log [\text{OH}^-] = -\log K_b - \log \frac{[\text{MOH}]}{[\text{M}^+]}$$

$$\text{pOH} = \text{p}K_b - \log \frac{[\text{MOH}]}{[\text{M}^+]}$$

$$\text{pOH} = \text{p}K_b + \log \frac{[\text{M}^+]}{[\text{MOH}]}$$

$$K_b = \frac{[\text{R-NH}_3^+][\text{OH}^-]}{[\text{R-NH}_2]}$$

$$[\text{OH}^-] = K_b \frac{[\text{R-NH}_2]}{[\text{R-NH}_3^+]}$$

$$\log [\text{OH}^-] = \log K_b + \log \frac{[\text{R-NH}_2]}{[\text{R-NH}_3^+]}$$

$$-\log [\text{OH}^-] = -\log K_b - \log \frac{[\text{R-NH}_2]}{[\text{R-NH}_3^+]}$$

$$\text{pOH} = \text{p}K_b - \log \frac{[\text{R-NH}_2]}{[\text{R-NH}_3^+]}$$

$$\text{pOH} = \text{p}K_b + \log \frac{[\text{R-NH}_3^+]}{[\text{R-NH}_2]} \quad (30)$$

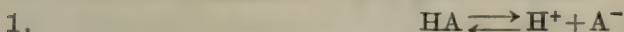
注意, 当共轭酸和共轭碱的浓度相等时, $\text{pH} = \text{p}K_a$, 并且 $\text{pOH} = \text{p}K_b$ 。从原来的 K_a 或 K_b 表达式可以看出同样的关系; 当 $[\text{A}^-] = [\text{HA}]$ 时, $[\text{H}^+] = K_a$; 而当 $[\text{R-NH}_2] = [\text{R-NH}_3^+]$ 时, $[\text{OH}^-] = K_b$ 。

根据上面的方程式, 含有 HA 和 A^- 溶液的 pH 与浓度无关, 该 pH 仅由共轭碱与共轭酸之比所确定。我们将会看到, 这是不完全正确的。我们暂时假定, 共轭碱与共轭酸的比是决定因素。只要 $[\text{A}^-]$ 和 $[\text{HA}]$ 比 K_a 大, 但又未大到必须校正活度系数的程度时, 则该假设是正确的。在通常实验室条件下, 这些浓度可能为 0.1 M 或更小, 而 K_a 值为 10^{-3} 或更小, 故满足此条件。

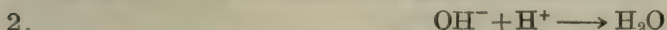
D. 实验室缓冲剂

弱酸的滴定

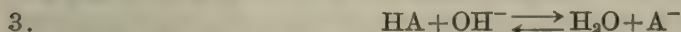
当用强碱滴定强酸时,任何一点的 pH 仅由未滴定的酸浓度或过量的碱浓度所决定(例题 1-17)。所形成的共轭碱(如 Cl^-)对 pH 无影响。当用强碱滴定弱酸时,情况就完全不同了。在水溶液中,弱酸解离,产生少量的 H^+ 离子。



当加入 OH^- 离子时,这些离子就被中和形成 H_2O 。



H^+ 离子的除去扰乱了弱酸与其离子之间的平衡。因而有更多的 HA 电离以便重新建立平衡。新产生的 H^+ 离子随即被另外加入的 OH^- 中和,如此进行,直至原来存在的 H^+ 离子全部被中和。反应 1 和反应 2 的综合结果就是 OH^- 对 HA 的滴定。



所需要的 OH^- 当量数等于所有氢(H^+ 加 HA)的总当量数。

由于 A^- 离子的水解,滴定的准确终点(等当量点)的 pH 不是 7 而是更高;也就是说,因为反应 3 本身就是一个平衡反应。在没有任何剩余 HA 存在时, A^- 离子将与 H_2O 反应产生 OH^- 离子和未解离的弱酸 HA。由于在弱酸和弱碱溶液中平衡条件必定永远被满足,只要共轭酸和共轭碱的浓度(或它们的浓度比)为已知,在滴定过程中, H^+ 离子浓度和 pH 就可以从 K_a 表达式或从 Henderson-Hasselbalch 方程计算出来。在计算滴定过程中的 $[\text{HA}]$ 和 $[\text{A}^-]$ 时,我们不妨假设:在这条曲线的绝大范围内,剩余 HA 的摩尔数等于原始 HA 的摩尔数减去已滴定 HA 的摩尔数;而且 A^- 的摩尔数等于已滴定 HA 的摩尔数。仅仅在接近等当量点时才会由于盐的水解而引起明显的误差。酸越弱(用 K_a 及原始浓度表示),由于忽视了水解,反常结果就出现得越早(用已滴定的原始酸的百分数表示)。

换句话说,如果 A^- 电离 10% (产生 $\text{HA} + \text{OH}^-$),那么, Henderson-Hasselbalch 方程就不能用以计算已滴定 99% 的 HA 溶液的 pH。

例题 1-25

用 0.1 M KOH 滴定 500 毫升 0.1 M 弱酸 HA, $K_a = 10^{-5}$ ($\text{p}K_a = 5.0$), 计算其相应数值并绘出滴定曲线。

解:

滴定曲线见图 1-2。各数值计算如下:

(a) 开始时, pH 仅取决于 HA 的浓度和 K_a 值。

$$\text{pH} = \frac{\text{p}K_a + \text{p}[\text{HA}]}{2} = \frac{5 + 1}{2} = 3.0$$

(b) 滴定过程中任意点的 pH 可按下列式计算:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

例如,加入 100 毫升 0.1 M KOH 后:

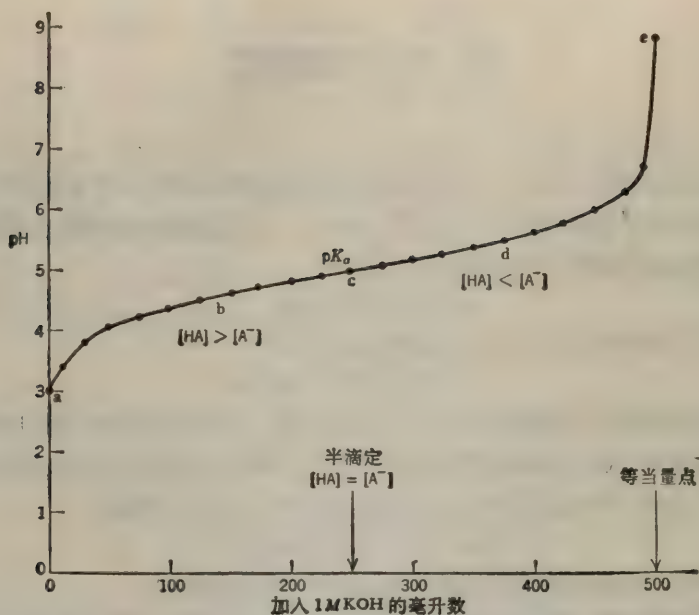


图 1-2 强碱(如 KOH)滴定一元弱酸 HA, $pK_a=5.0$; $[HA]_{\text{始}}=0.1M$ 。

加入的 OH^- 摩尔数 $= 0.1 \text{ 升} \times 0.1M = 0.01 \text{ 摩尔}$

\therefore 0.01 摩尔的 HA 已经转化成 0.01 摩尔的 A^-

剩余的 HA 摩尔数 = 原始 HA 摩尔数 - 滴定成 A^- 的 HA 摩尔数

$$= (0.5 \text{ 升} \times 0.1M) - 0.01 = 0.05 - 0.01 = 0.04 \text{ 摩尔}$$

体积变了, 但 A^- 与 HA 的摩尔比与 $[A^-]/[HA]$ 相同。

$$pH = 5.0 + \log \frac{0.01}{0.04} = 5.0 + \log 0.25$$

为了避免对小于 1 的数字取对数, Henderson-Hasselbalch 方程可以写成

$$\begin{aligned} pH &= pK_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]} = 5.0 - \log \frac{0.04}{0.01} \\ &= 5.0 - \log 4 = 5.0 - 0.602 \end{aligned}$$

$$pH = 4.40$$

(c) 当加入了 250 毫升 0.1 M KOH 时, 原始 HA 就有一半被滴定了。

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$[A^-] = [HA], \quad \frac{[A^-]}{[HA]} = 1, \quad \log 1 = 0$$

$$\therefore pH = pK_a \text{ 或 } pH = 5.0$$

(d) 超过半途点 (halfway point), pH 仍由下式给定:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

例如, 加入 375 毫升 0.1 M KOH 之后:

加入的 OH^- 摩尔数 = $0.375 \text{ 升} \times 0.1 \text{ M} = 0.0375 \text{ 摩尔}$

\therefore 0.0375 摩尔的 HA 已转化为 0.0375 摩尔的 A^-

剩余 HA = $0.0500 - 0.0375 = 0.0125$

$$\text{pH} = 5.0 + \log \frac{0.0375}{0.0125} = 5.0 + \log 3 = 5.0 + 0.477$$

$$\text{pH} = 5.48$$

注意, 当被滴定的酸不及一半时, 则 pH 小于 $\text{p}K_a$ 。当该酸刚好有一半被滴定时, pH 等于 $\text{p}K_a$ 。当被滴定的酸多于一半时, pH 大于 $\text{p}K_a$ 。

(e) 当正好加入 500 毫升 0.1 M KOH 时, 从理论上讲, 我们已经把全部 HA 滴定成 A^- 了。但是, 由于 A^- (HA 的盐或其共轭碱) 的电离, 终点的 pH 不是 7。



注意, 该电离反应式的反向阅读即为 OH^- 滴定 HA 的反应式。因此, 该滴定作用是一个不能进行到底的平衡反应。一摩尔 OH^- 加到一摩尔 HA 中并不恰好产生一摩尔 A^- 。终点的 pH 可以从 K_b 计算出来。首先要注意, 在终点处, A^- 的浓度是 $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ (500 毫升 0.1 M KOH 加进 500 毫升 0.1 M HA 中, 形成一升含有 0.05 摩尔 A^- 的溶液)。

$$K_b = \frac{[\text{HA}][\text{OH}^-]}{[\text{A}^-]} = \frac{K_w}{K_a} = \frac{10^{-14}}{10^{-9}} = 10^{-5}$$

$$\begin{aligned} \text{pOH} &= \frac{\text{p}K_b + \text{p}[\text{A}^-]}{2} = \frac{9 + \log \frac{1}{0.05}}{2} \\ &= \frac{9 + 1.30}{2} = \frac{10.30}{2} \end{aligned}$$

$$\text{pOH} = 5.15$$

$$\text{pH} = \text{p}K_w - \text{pOH} \quad \text{pH} = 14 - 5.15$$

$$\text{pH} = 8.85$$

如果从 A^- 出发, 并用 HCl 滴定, 则曲线基本上与图 1-2 所示相同, 其横坐标读数(从右向左)为“滴入的 0.1 M HCl 毫升数”。

何谓缓冲剂? 缓冲剂如何起作用?

“缓冲剂”是抵抗变化的某种东西。化学上常用的 pH 缓冲剂是一种物质或是几种物质的混合物, 它们能使溶液在加入了少量 H^+ 或 OH^- 时抵抗较大的 pH 变化。换句话说, 当溶液中加入少量 H^+ 或 OH^- 时, 缓冲剂帮助该溶液保持接近恒定的 pH。

常见的缓冲剂混合物包含两种物质: 共轭酸和共轭碱。“酸性”缓冲剂含有弱酸及该弱酸盐(共轭碱)。“碱性”缓冲剂含有弱碱及该弱碱盐(共轭酸)。这两种物质(共轭酸和共轭碱)在一起通过部分地吸收系统中加入的 H^+ 或 OH^- 以抵抗 pH 的较大变化。如果 H^+ 加到被缓冲溶液中, 它们部分地与所存在的共轭碱反应形成共轭酸。于是, 一些 H^+ 离子被去掉了。如果 OH^- 离子加到被缓冲溶液中, 它们就部分地与所存在的共轭酸反应形成水和共轭碱。于是一些 OH^- 离子被去掉了。当加入 H^+ 或 OH^- 离子后, 被缓冲溶液的 pH 确实是改变了。但这种变化要比没有缓冲剂时可能发生的变化小得多。pH 变化量取决于缓冲剂的强度和 $[\text{A}^-]/[\text{HA}]$ 比值(见缓冲容量)。用 KOH 滴定 HA 所得到的溶液(例题 1-25)

就是一缓冲剂。如果我们检查该滴定曲线, 就会看到, 在 pK_a 附近, 随着 OH^- 的加入, pH 仅有微小变化。因此, 在 $pH 5$ 附近, $HA + A^-$ 产生了良好的缓冲作用。但是, 在 $pH 7$ 时, 这种弱酸及其盐则组成一个很差的缓冲剂。如果我们希望制备一个在 $pH 7$ 起缓冲作用的溶液, 我们应该使用 pK_a 在 7 附近的弱酸。

例题 1-26

(a) 写出“醋酸盐”缓冲剂的组分。(b) 说明当加入 OH^- 和 H^+ 离子时醋酸盐缓冲剂阻止 pH 变化的反应。

解:

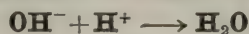
(a) “醋酸盐”缓冲剂含有未电离的醋酸($HOAc$)和醋酸根离子(OAc^-), 前者为共轭酸, 后者为共轭碱。 OAc^- 可以直接由 $NaOAc$ 、 $KOAc$ 等类物质提供或通过 KOH 或 $NaOH$ 部分中和 $HOAc$ 得到。

(b) 在含有弱酸(如 $HOAc$)的溶液中, 即, $[H^+]$ 与 $[OAc^-]$ 的乘积除以 $[HOAc]$ 必为一常数:

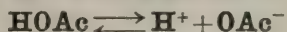
$$K_a = \frac{[H^+][OAc^-]}{[HOAc]}$$

K_a 表达式中, 三个组分中任何一组分浓度的改变都会引起其它两组分浓度的相应变化, 从而使 $[H^+][OAc^-]$ 除以 $[HOAc]$ 仍是同一恒定值(K_a)。

例如, 如果将 OH^- 离子加到该系统中, 它们就会与所存在的 H^+ 离子反应, 形成 H_2O 。



$[H^+]$ 的降低暂时地扰乱了平衡。所以, 有更多的 $HOAc$ 解离以重新建立平衡。



其净结果(和上述两个反应的总和一样)就好像是 OH^- 离子与醋酸盐缓冲剂的共轭酸直接反应以产生 H_2O 和更多的共轭碱 $[OAc^-]$ 。



当然, 所有这一切几乎是同时发生的。

同样, 如果将 H^+ 离子加入该系统, 平衡再次移动。这时共轭碱 $[OAc^-]$ 与某些过量 H^+ 离子反应形成未电离的 $HOAc$ 。



应当强调, 这些过量的 H^+ 或 OH^- 离子并没有完全被缓冲剂中和, 即在 H^+ 或 OH^- 离子加到缓冲剂时, pH 并不是保持绝对恒定的。吸收 H^+ 和 OH^- 离子的反应本身就是平衡反应, 不进行到底。

缓冲剂的制备

例题 1-27

在 $0.2 M$ “醋酸盐”缓冲剂($pH=5.00$)中, $HOAc$ 和 OAc^- 的浓度是多少? 醋酸的 K_a 值为 1.70×10^{-5} ($pK_a=4.77$)。

解:

“ $0.2 M$ 醋酸盐”缓冲剂每升所含“醋酸盐”总量为 0.2 摩尔。该总体醋酸盐中, 有些以共轭酸的形式($HOAc$)存在, 另一些则以共轭碱的形式(OAc^-)存在。每种形式的比例(因此其浓

度)可以借 K_a 表达式或 Henderson-Hasselbalch 方程求出。

$$K_a = \frac{[H^+][OAc^-]}{[HOAc]}$$

令

$$y = OAc^- \text{ 的 } M$$

$$\therefore 0.2 - y = HOAc \text{ 的 } M$$

$$pH = 5$$

$$\therefore [H^+] = 10^{-5}$$

$$1.7 \times 10^{-5} = \frac{(10^{-5})(y)}{(0.2 - y)}$$

$$3.4 \times 10^{-6} - 1.7 \times 10^{-5}y = 1 \times 10^{-5}y$$

$$3.4 \times 10^{-6} = 2.7 \times 10^{-5}y$$

$$y = \frac{3.4 \times 10^{-6}}{27 \times 10^{-6}}$$

$$y = 0.126$$

$$[OAc^-] = 0.126 M$$

$$[HOAc] = 0.200 - 0.126$$

$$[HOAc] = 0.074 M$$

或

$$pH = pK_a + \log \frac{[OAc^-]}{[HOAc]}$$

$$0.23 = \log \frac{[OAc^-]}{[HOAc]}$$

$$\frac{[OAc^-]}{[HOAc]} = 1.70 = \frac{1.70}{1}$$

$$\therefore \text{总体盐的 } \frac{1.70}{2.70} = OAc^- \text{ 和 总体盐的 } \frac{1.00}{2.70} = HOAc$$

$$\frac{1.70}{2.7} \times 0.2 M = 0.126$$

$$\frac{1.00}{2.70} \times 0.2 M = 0.074$$

$$pH = pK_a + \log \frac{[OAc^-]}{[HOAc]}$$

令

$$y = OAc^- \text{ 的 } M$$

$$\therefore 0.2 - y = HOAc \text{ 的 } M$$

$$5.00 = 4.77 + \log \frac{y}{0.2 - y}$$

$$0.23 = \log \frac{y}{0.2 - y}$$

$$\frac{y}{0.2 - y} = \text{antilog } 0.23$$

$$\frac{y}{0.2 - y} = 1.70$$

$$0.34 - 1.70y = y$$

$$0.34 = 2.7y$$

$$y = 0.126$$

$$[OAc^-] = 0.126 M$$

$$[HOAc] = 0.2 - y M$$

$$[HOAc] = 0.2 - 0.126$$

$$[HOAc] = 0.074 M$$

$$5 = 4.77 + \log \frac{[OAc^-]}{[HOAc]}$$

$$\frac{[OAc^-]}{[HOAc]} = \text{antilog } 0.23$$

$$[OAc^-] = 0.126 M$$

$$[HOAc] = 0.074 M$$

验算: 该 pH 高于 pK_a , \therefore 该溶液中共轭碱应多于共轭酸。共轭碱 = 0.126 M, 共轭酸 = 0.074 M。

例题 1-28

叙述从固体醋酸钠(含三个结晶水, MW = 136)和 1 M 醋酸溶液制备 3 升 0.2 M, pH 5 醋酸缓冲剂的方法。

解:

首先计算缓冲剂中 OAc^- 和 $HOAc$ 的摩尔浓度。例题 1-27 中所给的三种方法的任一种都可用来求得 $[OAc^-] = 0.126 M$ 和 $[HOAc] = 0.074 M$ 。我们需要 3 升 0.2 M 的缓冲剂。

$$3 \text{ 升} \times 0.2 M = 0.6 \text{ 摩尔}(HOAc \text{ 和 } OAc^-)$$

全部 0.6 摩尔从两个来源得到:

$$3 \text{ 升} \times 0.126 \text{ M} = 0.378 \text{ 摩尔} (\text{OAc}^-)$$

$$3 \text{ 升} \times 0.074 \text{ M} = 0.222 \text{ 摩尔} (\text{HOAc})$$

0.378 摩尔的 OAc^- 来自固体 NaOAc .

$$\text{摩尔数} = \frac{\text{wt}_{\text{克}}}{\text{MW}}, \quad 0.378 = \frac{\text{wt}_{\text{克}}}{136}$$

$$\text{wt}_{\text{克}} = 51.4 \text{ 克}$$

0.222 摩尔的 HOAc 来自 1 M 储备液.

$$\text{摩尔数} = \text{体积(升)} \times M, \quad 0.222 = \text{体积(升)} \times 1$$

$$\text{体积(升)} = 0.222 \text{ 或 } 222 \text{ 毫升}$$

所以, 制备 3 升该缓冲剂时, 将 51.4 克的醋酸钠溶于少量水中, 加入 222 毫升 1 M 的醋酸, 然后稀释至总体积为 3.0 升.

例题 1-29

叙述从 2 M 醋酸溶液和 2.5 M KOH 溶液制备 5 升 0.3 M, pH 4.47 醋酸盐缓冲剂的方法.
解:

和前面的例题一样, 首先计算现有的两类醋酸盐的比例.

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{OAc}^-]}{[\text{HOAc}]}, \quad 4.47 = 4.77 + \log \frac{[\text{OAc}^-]}{[\text{HOAc}]}$$

$$-0.30 = \log \frac{[\text{OAc}^-]}{[\text{HOAc}]} \quad \text{或} \quad +0.30 = \log \frac{[\text{HOAc}]}{[\text{OAc}^-]}$$

$$\frac{[\text{HOAc}]}{[\text{OAc}^-]} = \text{antilog } 0.3 = 2 = \frac{2}{1}$$

\therefore 在总体醋酸盐中, $\frac{2}{3}$ 以 HOAc 的形式存在, 而 $\frac{1}{3}$ 以 OAc^- 的形式存在. 最后的溶液中含有:

$$\frac{2}{3} \times 0.3 \text{ M} = 0.2 \text{ M HOAc} \quad (5 \text{ 升中含 } 1 \text{ 摩尔})$$

$$\frac{1}{3} \times 0.3 \text{ M} = 0.1 \text{ M OAc}^- \quad (5 \text{ 升中含 } 0.5 \text{ 摩尔})$$

在此缓冲剂中, 所有的醋酸盐必须由 HOAc 提供. 该缓冲剂是将适当比例的 HOAc 通过加 KOH 转变成 OAc^- 而制备的. 我们共需要醋酸盐 = 5 升 \times 0.3 M = 1.5 摩尔. 计算要获得 1.5 摩尔的醋酸盐需多少 2 M HOAc 储备液.

$$\text{体积(升)} \times M = \text{摩尔数}$$

$$\text{体积(升)} \times 2 = 1.5, \quad \text{体积(升)} = \frac{1.5}{2} = 0.75$$

\therefore 需要 750 毫升 2 M HOAc .

其次, 加入适量的 2.5 M KOH 将 1.5 摩尔的 $\frac{1}{3}$ 转化为 OAc^- .

$$\text{所需 KOH} = \frac{1}{3} \times 1.5 \text{ 摩尔} = 0.5 \text{ 摩尔}$$

$$\begin{aligned}\text{体积(升)} \times M &= \text{摩尔数} \\ \text{体积(升)} \times 2.5 &= 0.5 \text{ 摩尔}\end{aligned}$$

$$\text{体积(升)} = \frac{0.5}{2.5} = 0.2 \text{ 升}$$

∴ 加 200 毫升 2.5 M 的 KOH.

现在该溶液含 1 摩尔 HOAc 和 0.5 摩尔 OAc⁻. 最后加足水量使体积达到 5 升. 最终溶液含 0.2 M HOAc 和 0.1 M OAc⁻.

缓冲剂的 pH 变化

通常, 在产生和利用 H⁺ 离子的反应过程中, 缓冲剂用于保持 pH 相对地恒定. 下一节我们将会看到, 缓冲剂保持 pH 近乎恒定的能力是随缓冲剂浓度的增加而提高的. 但是使用相对浓度的缓冲剂并非永远可行. 所研究的酶、组织或细胞可能对于大离子强度敏感或者该试验方法在实验终了时需要很方便地将 pH 调到较高或较低值. 因此, 有必要采取折衷的办法. 对缓冲剂的浓度和 pH 要进行选择, 以便使 pH 尽可能保持近乎恒定而又不会由于较大的离子强度而造成麻烦. 有些情况下, 我们希望 pH 有明显变化(例如, 用 pH 变化测定反应程度时). 在这种情况下, 只要不使 pH 超出所研究的反应的选择范围, 我们宁愿尽量用缓冲剂的最低浓度.

例题 1-30

用数学证明为什么醋酸盐缓冲剂在加入 H⁺ 后不能保持绝对恒定的 pH.

解:

设有一缓冲剂含 0.01 M 的 HA 和 0.01 M 的 A⁻. 假设此弱酸的 K_a 也是 10⁻⁵, 因而, H⁺ 离子浓度也一定是 10⁻⁵ M.

$$\frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = K_a, \quad \frac{(10^{-5})(10^{-2})}{(10^{-2})} = 10^{-5}$$

现在, 假定把 10⁻³ M 的 H⁺ 加到此缓冲剂中. 如果全部 H⁺ 均与 A⁻ 反应, 生成 HA (因而保持 [H⁺] 为 10⁻⁵ M), [HA] 的新浓度会是 1.1 × 10⁻² M, 而 A⁻ 的新浓度应是 0.9 × 10⁻² M. 把这些数值代入 K_a 表达式中, 我们可以看到, [H⁺][A⁻] 除以 [HA] 并不恒等于 10⁻⁵.

$$\frac{(10^{-5})(0.9 \times 10^{-2})}{(1.1 \times 10^{-2})} \neq 10^{-5}$$

例题 1-31

设想一个含有 10⁻³ M HA 和 10⁻³ M A⁻ 的 0.002 M 酸性缓冲剂, 其 pH = pK_a = 5 (K_a = 10⁻⁵). 假定向 1 升该缓冲剂中加入 5 × 10⁻⁴ 摩尔 H⁺ (假设体积仍为 1 升). (a) 计算加入 HCl 后 A⁻ 和 HA 的精确浓度以及溶液的 pH, (b) 假设 HA 的增加量 (以及 A⁻ 的减少量) 等于 H⁺ 的添加量, 计算 A⁻ 和 HA 的浓度以及溶液的 pH.

解:

所加入的 H⁺ 部分地用于与 A⁻ 反应, 形成未电离的 HA.



(a) 令

y = 为缓冲剂所耗用的 H⁺ 的 M

$$\begin{aligned}
[A^-] &= 10^{-3} - y \text{ M}, \quad [HA] = 10^{-3} + y \text{ M} \\
[H^+] &= 10^{-5} + 5 \times 10^{-4} - y = 51 \times 10^{-5} - y \\
K_a &= \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = \frac{(51 \times 10^{-5} - y)(10^{-3} - y)}{(10^{-3} + y)} = 10^{-5}
\end{aligned}$$

交叉相乘:

$$10^{-8} + 10^{-5}y = 51 \times 10^{-8} - 51 \times 10^{-5}y - 10^{-3}y + y^2$$

重排且合并同类项:

$$\begin{aligned}
y^2 - 10^{-3}y - 51 \times 10^{-5}y - 10^{-5}y + 51 \times 10^{-8} - 10^{-8} &= 0 \\
y^2 - 100 \times 10^{-5}y - 51 \times 10^{-5}y - 1 \times 10^{-5}y + 50 \times 10^{-8} &= 0 \\
y^2 - 152 \times 10^{-5}y + 50 \times 10^{-8} &= 0 \\
y &= \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}
\end{aligned}$$

式中, $a=1$, $b=-152 \times 10^{-5}$, $c=50 \times 10^{-8}$.

$$\begin{aligned}
y &= \frac{+152 \times 10^{-5} \pm \sqrt{(-15.2 \times 10^{-4})^2 - 4(50 \times 10^{-8})}}{2} \\
y &= \frac{15.2 \times 10^{-4} \pm \sqrt{231 \times 10^{-8} - 200 \times 10^{-8}}}{2} \\
y &= \frac{15.2 \times 10^{-4} \pm \sqrt{31 \times 10^{-8}}}{2} = \frac{15.20 \times 10^{-4} \pm 5.57 \times 10^{-4}}{2} \\
y &= \frac{20.77 \times 10^{-4}}{2} \text{ 和 } \frac{9.63 \times 10^{-4}}{2} \\
y &= 10.39 \times 10^{-4} \text{ 和 } 4.815 \times 10^{-4} \text{ M}
\end{aligned}$$

较大的数值显然是错误的, 因为仅加入了 $5 \times 10^{-4} \text{ M H}^+$

$$\therefore y = 4.815 \times 10^{-4} \text{ M}$$

因此, 最初加入的 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 的 H^+ 中, 有 $4.815 \times 10^{-4} \text{ M}$ 被该缓冲剂耗用了. 最后的 H^+ 离子浓度提高了 $0.185 \times 10^{-4} \text{ M}$.

$$\begin{aligned}
[H^+]_{\text{总}} &= (1 \times 10^{-5}) + (1.85 \times 10^{-5}) \quad [H^+]_{\text{总}} = 2.85 \times 10^{-5} \text{ M} \\
[A^-]_{\text{总}} &= (10 \times 10^{-4}) - (4.82 \times 10^{-4}) \quad [A^-]_{\text{总}} = 5.18 \times 10^{-4} \text{ M} \\
[HA]_{\text{总}} &= (10 \times 10^{-4}) + (4.82 \times 10^{-4}) \quad [HA]_{\text{总}} = 14.82 \times 10^{-4} \text{ M} \\
\text{pH}_{\text{总}} &= \log \frac{1}{[H^+]_{\text{总}}} = \log \frac{1}{2.85 \times 10^{-5}} \\
&= \log 0.351 \times 10^5 = \log 3.51 \times 10^4 \\
\text{pH} &= 4.545
\end{aligned}$$

换句话说, pH 降低了 0.455 单位.

(b) 如果假设实际上全部 H^+ 与 A^- 反应, 形成 HA, 以便简化计算.

$$\begin{aligned}
[A^-]_{\text{总}} &= (10 \times 10^{-4}) - (5 \times 10^{-4}) \quad [A^-]_{\text{总}} = 5.0 \times 10^{-4} \text{ M} \\
[HA]_{\text{总}} &= (10 \times 10^{-4}) + (5 \times 10^{-4}) \quad [HA]_{\text{总}} = 15 \times 10^{-4} \text{ M}
\end{aligned}$$

所求新 $[\text{H}^+]$ 是与 $15 \times 10^{-4} \text{ M HA}$ 和 $5 \times 10^{-4} \text{ M A}^-$ 处于平衡状态时的浓度. 如(a)所示, 由于该 $[\text{HA}]/[\text{A}^-]$ 比值实际上比 3:1 稍小, 该计算值会有些偏高.

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

令

$y = \text{所含 } H^+ \text{ 的 } M$

$$10^{-5} = \frac{(y)(5 \times 10^{-4})}{(15 \times 10^{-4})}$$

$$15 \times 10^{-9} = (5 \times 10^{-4})y$$

$$y = \frac{15 \times 10^{-9}}{5 \times 10^{-4}}$$

$$y = 3 \times 10^{-5}$$

$$[H^+] = 3 \times 10^{-5} M$$

计算出来的 H^+ 浓度增量为 $2 \times 10^{-5} M$ (与真实值 $1.85 \times 10^{-5} M$ 比较)

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$pH = 5.00 + \log \frac{(5 \times 10^{-4})}{(15 \times 10^{-4})}$$

$$pH = 5.00 - \log \frac{(15 \times 10^{-4})}{(5 \times 10^{-4})}$$

$$pH = 5.00 - \log 3$$

$$pH = 5.00 - 0.477$$

$$pH = 4.523$$

计算出来的 pH 减量为 0.477 单位 (与真实值为 0.455 比较)

我们可以看到, 根据假设, 该缓冲剂与加入的 H^+ 完全地反应所引起的误差是很小的。在上面的例题中, 缓冲剂相对的弱且加入的 H^+ 量与原始 A^- 浓度属同一数量级。实际上, 所用的缓冲剂浓度要比所预料的 H^+ (或 OH^-) 离子浓度变化高。因而, 正如以上 (b) 部分所示, 缓冲剂的计算可以大大简化, 而不会产生太大的误差。

例题 1-32

某酶促反应在 $0.2 M$ 的“Tris”缓冲剂 (pH 7.8) 中完成。反应结果产生了 0.03 摩尔/升 H^+ 。
(a) 反应开始时, $Tris^+$ (共轭酸)/ $Tris^0$ (共轭碱) 的比值是多少? (b) 反应开始时 $Tris^+$ 和 $Tris^0$ 的浓度是多少? (c) 写出该缓冲剂维持几乎恒定 pH 的反应。(d) 反应终了时 $Tris^0$ 和 $Tris^+$ 的浓度是多少? (e) 反应终了时 pH 是多少? Tris 的 pK_a 是 8.1。(f) 如果没有缓冲剂, 最终 pH 会是多少?

解:

$$(a) \quad pH = pK_a + \log \frac{Tris^0}{Tris^+}, \quad 7.8 = 8.1 + \log \frac{Tris^0}{Tris^+}$$

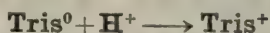
$$-0.3 = \log \frac{Tris^0}{Tris^+} \quad \text{或} \quad +0.3 = \log \frac{Tris^+}{Tris^0}$$

$$\frac{Tris^+}{Tris^0} = \text{antilog } 0.3 = 2 \quad \frac{Tris^+}{Tris^0} = \frac{2}{1}$$

$$(b) \quad \frac{2}{3} \times 0.2 M = 0.133 M \text{ Tris}^+ \quad \text{而} \quad \frac{1}{3} \times 0.2 M = 0.067 M \text{ Tris}^0$$

验算: pH 小于 pK_a ; \therefore [共轭酸] > [共轭碱]; $0.133 M > 0.067 M$ 。

(c) 共轭碱与过量 H^+ 的反应:



(d) 反应结果, $Tris^+$ 和 $Tris^0$ 的含量变化如下:

$$[Tris^+] = 0.133 + 0.030 = 0.163 M$$

$$[Tris^0] = 0.067 - 0.030 = 0.037 M$$

$$\begin{aligned} \text{(e)} \quad \text{pH} &= \text{p}K_a + \log \frac{\text{Tris}^0}{\text{Tris}^+} = 8.1 + \log \frac{0.037}{0.163} \\ &= 8.1 - \log \frac{0.163}{0.037} = 8.1 - \log 4.4 \end{aligned}$$

$$\text{pH} = 8.1 - 0.644 \quad \text{pH} = 7.456$$

(f) 如果没有缓冲剂,产生的 0.03 M H^+ 将使 pH 成为

$$\begin{aligned} \text{pH} &= \log \frac{1}{[\text{H}^+]} = \log \frac{1}{0.03} = \log 33.33 \\ \text{pH} &= 1.52 \end{aligned}$$

(在 pH 降到 1.52 以前,该酶很可能已经变性了。)

理论缓冲容量与实际缓冲容量

缓冲剂抵抗 pH 变化的能力称为“缓冲容量”。“缓冲容量”可以用两种方式定义:(1)使 pH 发生一定变化(例如一个单位)每升缓冲剂所需要的 H^+ 或 OH^- 的摩尔数;或(2)加入一定量的 H^+ 或 OH^- (例如 1 摩尔/升)后,缓冲剂所发生的 pH 变化。第一种定义较好,因为它能用于任何浓度的缓冲剂。

用微积分可以导出瞬时缓冲容量 β 的表达式。实质上 β 是滴定曲线上任何一点的斜率的倒数。从 Henderson-Hasselbalch 方程出发:

$$\begin{aligned} \text{pH} &= \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = \text{p}K_a + \log [\text{A}^-] - \log [\text{HA}] \\ &= \text{p}K_a + \log [\text{A}^-] - \log ([C] - [\text{A}^-]) \\ &= \text{p}K_a + \frac{\ln [\text{A}^-]}{2.3} - \frac{\ln ([C] - [\text{A}^-])}{2.3} \end{aligned}$$

式中, C = 缓冲剂组分的总浓度 = $[\text{A}^-] + [\text{HA}]$ 。对 $[\text{A}^-]$ 微分:

$$\frac{d\text{pH}}{d[\text{A}^-]} = \frac{1}{2.3[\text{A}^-]} + \frac{1}{2.3([C] - [\text{A}^-])} = \frac{[C]}{2.3[\text{A}^-]([C] - [\text{A}^-])}$$

$d[\text{A}^-]$ 与 $d[\text{H}^+]$ 或 $d[\text{OH}^-]$ 相等,因为每加一摩尔 H^+ 就有一摩尔 A^- 被耗用;每加一摩尔 OH^- 就产生一摩尔 A^- 。代入并倒置,

$$\frac{d[\text{H}^+]}{d\text{pH}} = \frac{d[\text{OH}^-]}{d\text{pH}} = \frac{2.3[\text{A}^-]([C] - [\text{A}^-])}{[C]} = \beta$$

或

$$\beta = \frac{2.3[\text{A}^-][\text{HA}]}{[\text{A}^-] + [\text{HA}]} \quad (31)$$

再将 K_a 代入该表达式中,得到

$$\beta = \frac{2.3K_a[\text{H}^+][C]}{(K_a + [\text{H}^+])^2} \quad \text{或} \quad \beta = 0.575[C] \quad (32)$$

式中, $[\text{H}^+]$ = 该缓冲剂的 H^+ 离子浓度。

我们看到, β 随缓冲剂浓度的提高而增大。我们或许已经直观地得出了这个结论。 0.25 M 缓冲剂应当比 0.01 M 缓冲剂更好地抵抗 pH 变化的看法似乎是合乎逻辑的。我们还可以证明(通过微积分或反复试算),当 $[\text{A}^-] = [\text{HA}]$ 或 $[\text{H}^+] = K_a$ 时, β 将有最大值;即在滴定曲线 $\text{pH} = \text{p}K_a$ 处的斜率最小。同样,当 $[\text{H}^+] = K_a$, $\beta = 2.3[\text{H}^+]^2[C]/(2[\text{H}^+])^2 = 2.3[\text{H}^+]^2[C]/4[\text{H}^+]^2$ 或 $\beta = 0.575[C]$ 。

由于 β 与滴定曲线上某点的斜率有关, 不论是向缓冲剂中加入 H^+ 或是加入 OH^- , 其数值是一样的。缓冲容量的更实用的定义是

缓冲容量_a = 使 1 升缓冲剂减少 1 个 pH 单位必须加入的 H^+ 摩尔数
= 酸向缓冲容量

缓冲容量_b = 使 1 升缓冲剂增加 1 个 pH 单位必须加入的 OH^- 摩尔数
= 碱向缓冲容量 (33)

生化反应很少产生 OH^- 离子, 然而很多反应都消耗 H^+ 离子。在反应过程中, 耗用 n 摩尔/升的 H^+ 与加入 n 摩尔/升的 OH^- 对于缓冲剂的效果是一样的。

例题 1-33

计算 0.05 M, pH 7.5 Tricine 缓冲剂的 (a) 瞬时缓冲容量, (b) 酸, 碱两向的实际缓冲容量。Tricine 是 *N*-三(羟甲基)-甲基甘氨酸, $\text{p}K_a = 8.15$ ($K_a = 7.08 \times 10^{-9}$)。

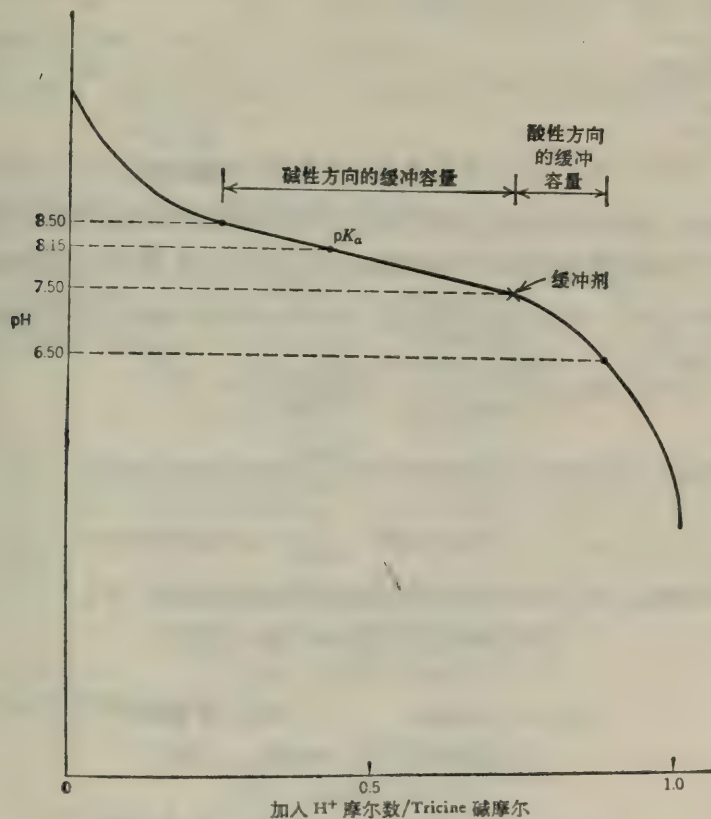


图 1-3 强酸(如 HCl)滴定一元弱碱(如 Tricine)。Tricine 的 $\text{p}K_a = 8.15$ 。

解:

显示 Tricine(碱)缓冲位置的滴定曲线绘制如图 1-3。该曲线表明用 H^+ 滴定 Tricine 共轭碱的情况。用 OH^- 滴定 Tricine 共轭酸的曲线应是这条曲线的镜像。该缓冲剂的 pH 小于 $\text{p}K_a$, 故 $[\text{Tricine}^+] > [\text{Tricine}^0]$, 如以下所示。

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{Tricine}^0]}{[\text{Tricine}^+]}, \quad 7.50 = 8.15 + \log \frac{[\text{Tricine}^0]}{[\text{Tricine}^+]}$$

$$7.50 = 8.15 - \log \frac{[\text{Tricine}^+]}{[\text{Tricine}^0]}, \quad 0.65 = \log \frac{[\text{Tricine}^+]}{[\text{Tricine}^0]}$$

$$\frac{[\text{Tricine}^+]}{[\text{Tricine}^0]} = \frac{4.47}{1}$$

$$[\text{Tricine}^+] = \frac{4.47}{5.47} \times 0.05 = 0.041 \text{ M}$$

$$[\text{Tricine}^0] = \frac{1}{5.47} \times 0.05 = 0.009 \text{ M}$$

$$\text{当 pH} = 7.5 \text{ 时, } [\text{H}^+] = 3.16 \times 10^{-8} \text{ M}$$

$$\begin{aligned} \beta &= \frac{2.3K_a[\text{H}^+][\text{C}]}{(K_a + [\text{H}^+])^2} \\ &= \frac{(2.3)(7.08 \times 10^{-9})(3.16 \times 10^{-8})(0.05)}{(7.08 \times 10^{-9} + 3.16 \times 10^{-8})^2} \\ &= \frac{2.57 \times 10^{-17}}{(3.87 \times 10^{-8})^2} \\ &= \frac{2.57 \times 10^{-17}}{1.50 \times 10^{-15}} \end{aligned}$$

$$\beta = 0.017 \text{ M}$$

或

$$\begin{aligned} \beta &= \frac{2.3[\text{Tricine}^0][\text{Tricine}^+]}{[\text{Tricine}^0] + [\text{Tricine}^+]} \\ &= \frac{2.3[\text{Tricine}^0][\text{Tricine}^+]}{C} \\ &= \frac{(2.3)(0.041)(0.009)}{0.05} \\ &= \frac{8.49 \times 10^{-4}}{5 \times 10^{-2}} \end{aligned}$$

$$\beta = 0.017 \text{ M}$$

(b) 从滴定曲线可以看出, 碱向实际缓冲容量大于酸向实际缓冲容量. 为了计算 BC_a , 我们先计算 pH 6.5 时 (比该缓冲剂小一个 pH 单位) 的 Tricine^+ 和 Tricine^0 的浓度.

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{Tricine}^0]}{[\text{Tricine}^+]}, \quad 6.50 = 8.15 + \log \frac{[\text{Tricine}^0]}{[\text{Tricine}^+]}$$

$$1.65 = \log \frac{[\text{Tricine}^+]}{[\text{Tricine}^0]}, \quad \frac{[\text{Tricine}^+]}{[\text{Tricine}^0]} = \frac{44.7}{1}$$

$$\therefore \text{当 pH} = 6.5 \text{ 时: } [\text{Tricine}^+] = \frac{44.7}{45.7} \times 0.05 = 0.049 \text{ M}$$

$$[\text{Tricine}^0] = \frac{1}{45.7} \times 0.05 = 0.001 \text{ M}$$

其次, 计算使共轭酸和共轭碱的原始浓度变成最终浓度所需要的 $[\text{H}^+]$.

$$[\text{Tricine}^+]_{\text{总}} = [\text{Tricine}^+]_{\text{终}} + [\text{H}^+]$$

$$0.049 = 0.041 + [\text{H}^+]$$

$$[\text{H}^+] = 0.008 \text{ M} \quad \therefore \text{BC}_a = 0.008 \text{ M}$$

或

$$[\text{Tricine}^0]_{\text{总}} = [\text{Tricine}^0]_{\text{终}} - [\text{H}^+]$$

$$0.001 = 0.009 - [\text{H}^+]$$

$$[\text{H}^+] = 0.008 \text{ M} \quad \therefore \text{BC}_a = 0.008 \text{ M}$$

计算 BC_b 时, 我们以同样方法求得 pH 8.5 时 Tricine^0 和 Tricine^+ 的浓度.

$$8.5 = 8.15 + \log \frac{[\text{Tricine}^0]}{[\text{Tricine}^+]}$$

$$0.35 = \log \frac{[\text{Tricine}^0]}{[\text{Tricine}^+]}, \quad \frac{[\text{Tricine}^0]}{[\text{Tricine}^+]} = \frac{2.24}{1}$$

$$[\text{Tricine}^0] = \frac{2.24}{3.24} \times 0.05 \text{ M} = 0.035 \text{ M}$$

$$[\text{Tricine}^+] = \frac{1}{3.24} \times 0.05 \text{ M} = 0.015 \text{ M}$$

现在, 计算可使原始浓度变为最终浓度所必须加入的 OH^- 量(或必须去掉的 H^+ 量)。

$$[\text{Tricine}^0]_{\text{终}} = [\text{Tricine}^0]_{\text{始}} + [\text{OH}^-]$$

$$0.035 = 0.009 + [\text{OH}^-]$$

$$[\text{OH}^-] = 0.026 \text{ M} \quad \therefore \text{BC}_b = 0.026 \text{ M}$$

或

$$[\text{Tricine}^+]_{\text{终}} = [\text{Tricine}^+]_{\text{始}} - [\text{OH}^-]$$

$$0.015 = 0.041 - [\text{OH}^-]$$

$$[\text{OH}^-] = 0.026 \text{ M} \quad \therefore \text{BC}_b = 0.026 \text{ M}$$

因此, 碱向实际缓冲容量比酸向实际缓冲容量大二倍多。当 $\text{pH} = 7.5$ 时, $\text{BC}_b > \beta$, 但 $\text{BC}_a < \beta$ 。假如该缓冲剂的 pH 是 8.15 的话(即 $\text{pH} = \text{p}K_a$),

$$\text{BC}_a = \text{BC}_b \approx 0.020 \text{ M}$$

且

$$\beta \approx 0.029 \text{ M}$$

即, 位于 $\text{p}K_a$ 和 $\text{p}K_a + 1$ (或 $\text{p}K_a$ 和 $\text{p}K_a - 1$) 间曲线的斜率大于滴定曲线上 $\text{pH} = \text{p}K_a$ 处的切线斜率。

我们可以导出一个计算实际缓冲容量的一般公式来代替上述的逐步运算。例如, 设 pH_1 为原始 pH , 而 pH_2 为最终(较低的) pH , 求 BC_a :

$$\text{pH}_1 = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]_1}{[\text{HA}]_1} \quad \text{及} \quad \text{pH}_2 = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]_2}{[\text{HA}]_2}$$

$$\therefore \text{pH}_1 - \text{pH}_2 = 1 = \left(\text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]_1}{[\text{HA}]_1} \right) - \left(\text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]_2}{[\text{HA}]_2} \right)$$

或

$$1 = \log \frac{[\text{A}^-]_1}{[\text{HA}]_1} - \log \frac{[\text{A}^-]_2}{[\text{HA}]_2}$$

或

$$1 = \log \frac{[\text{A}^-]_1 [\text{HA}]_2}{[\text{HA}]_1 [\text{A}^-]_2} \quad \therefore \frac{[\text{A}^-]_1 [\text{HA}]_2}{[\text{HA}]_1 [\text{A}^-]_2} = 10$$

将 $[\text{HA}]_2 = [\text{HA}]_1 + [\text{H}^+]$ 和 $[\text{A}^-]_2 = [\text{A}^-]_1 - [\text{H}^+]$ 代入公式, 相乘后归并同类项并求解 $[\text{H}^+]$:

$$[\text{H}^+] = \text{BC}_a = \frac{9[\text{HA}]_1 [\text{A}^-]_1}{10[\text{HA}]_1 + [\text{A}^-]_1} \quad (34)$$

同样, 我们也可以导出求 BC_b 的公式:

$$[\text{OH}^-] = \text{BC}_b = \frac{9[\text{HA}]_1 [\text{A}^-]_1}{10[\text{A}^-]_1 + [\text{HA}]_1} \quad (35)$$

对于 Tricine, $\text{HA} = \text{Tricine}^+$, $\text{A}^- = \text{Tricine}^0$ 。

例题 1-34

在前面的例题中我们看到, 为使 0.05 M Tricine 缓冲剂 ($\text{pH} 7.5$) 降低 1 pH 单位, 每升缓冲剂需要 8×10^{-3} 摩尔 H^+ 。(a) 加入 $4 \times 10^{-3} \text{ M}$ H^+ 会使 pH 降低 0.5 单位吗? (b) 加入 $4 \times 10^{-3} \text{ M}$ H^+ 所引起的 ΔpH 是多少?

解:

(a) 滴定曲线并非一条直线, 而且 pH 标度是对数标度而不是线性标度。所以, 添加的 H^+ 和 ΔpH 之间不成正比。因而, 使 pH 降低 0.5 单位所需之 H^+ 并不是使 pH 降低 1 单位所需 H^+ 的一半。所需 H^+ 的准确量可象前面例题那样较容易地计算出来, 但最终 pH 用 pH 7.0 取代。在 pH=7 时, 我们将会看到:

$$[Tricine^+] = 0.047 M \quad \therefore [H^+]_{\text{添加}} = 0.006 M$$

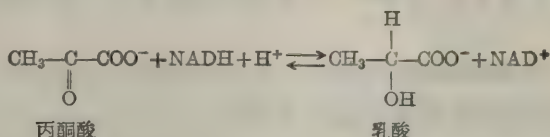
所以, 降低 0.5 pH 单位所需 H^+ 比降低 1.0 pH 单位所需 H^+ 的一半要多。

$$\begin{aligned} (b) \quad pH &= 8.15 + \log \frac{0.009 - 0.004}{0.041 + 0.004} \\ &= 8.15 + \log \frac{0.005}{0.045} = 8.15 - \log 9 = 8.15 - 0.95 \\ pH &= 7.2 \quad \Delta pH = 0.3 \end{aligned}$$

因此, 一半 H^+ 使 pH 降低不到 0.5 单位。

例题 1-35

乳酸脱氢酶催化如下所示的可逆反应:



假设你所注意的酶在 pH 7.9 和 pH 8.3 之间有一个较平的 pH 平稳段 (最适 pH)。超出了这一范围, 反应速度明显降低。该酶在大离子强度下也迅速失活。你希望按乳酸生成的方向测定此酶。该反应使之进行到产生 0.05 M 乳酸时为止。为使酶失活作用降到最低限度, 你必须尽可能使用低浓度的缓冲剂, 以便使 pH 仍维持在 7.9 到 8.4 之间。你决定用 Tris 做缓冲剂。

详述你的缓冲剂的特点; 即, 指明该试验混合物的原始 pH、最终 pH、反应始终之共轭酸和共轭碱的浓度以及缓冲剂总浓度 (共轭酸和共轭碱)。Tris 之 pK_a 值为 8.1。

解:

该反应消耗 H^+ 离子, 所以要从最低容许 pH (7.9) 开始。pH 将随反应的进行而升高, 但最终 pH 不能大于 8.4。本题要计算能使 pH 保持在这一限度内的 Tris 缓冲剂浓度 C , 因而 C 是未知数。开始时:

$$\begin{aligned} pH &= pK_a + \log \frac{[Tris^0]_{\text{始}}}{[Tris^+]_{\text{始}}}, \quad 7.9 = 8.1 + \log \frac{[Tris^0]_{\text{始}}}{[Tris^+]_{\text{始}}} \\ \frac{[Tris^+]_{\text{始}}}{[Tris^0]_{\text{始}}} &= \text{antilog } 0.2 \\ \frac{[Tris^+]_{\text{始}}}{[Tris^0]_{\text{始}}} &= \frac{1.585}{1} \quad \text{或} \quad [Tris^+]_{\text{始}} = \frac{1.585}{2.585} [C] = 0.613 [C] \end{aligned}$$

$$\text{而且} \quad [Tris^0]_{\text{始}} = \frac{1}{2.585} [C] = 0.387 [C]$$

$$\text{终了时:} \quad pH = pK_a + \log \frac{[Tris^0]_{\text{终}}}{[Tris^+]_{\text{终}}}, \quad 8.4 = 8.1 + \log \frac{[Tris^0]_{\text{终}}}{[Tris^+]_{\text{终}}}$$

$$\frac{[\text{Tris}^0]_{\text{终}}}{[\text{Tris}^+]_{\text{终}}} = \text{antilog } 0.3$$

$$\frac{[\text{Tris}^0]_{\text{终}}}{[\text{Tris}^+]_{\text{终}}} = \frac{2}{1} \text{ 或 } [\text{Tris}^0]_{\text{终}} = \frac{2}{3} [C] = 0.667 [C]$$

$$\text{且 } [\text{Tris}^+]_{\text{终}} = \frac{1}{3} [C] = 0.333 [C]$$

$$[\text{Tris}^+]_{\text{终}} = [\text{Tris}^+]_{\text{始}} - 0.05$$

$$\therefore 0.333 [C] = 0.613 [C] - 0.05$$

$$0.05 = 0.28 [C], \quad [C] = \frac{0.05}{0.28}$$

$$[C] = 0.1786 M$$

于是,开始时,该缓冲剂含有

$$[\text{Tris}^+] = (0.613)(0.1786) = 0.1095 M$$

$$[\text{Tris}^0] = (0.387)(0.1786) = 0.0691 M$$

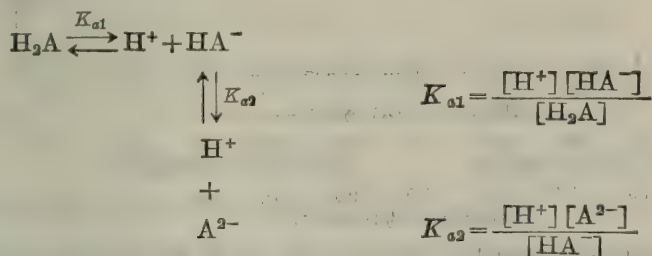
反应终了时,缓冲剂含有

$$[\text{Tris}^+] = (0.333)(0.1786) = 0.0595 M$$

$$[\text{Tris}^0] = (0.667)(0.1786) = 0.1191 M$$

多元酸

多元酸是分步电离的:



注意, HA^- 是 H_2A 的共轭碱, 也是 A^{2-} 的共轭酸. 对于大多数普通二元弱酸来说, K_{a1} 至少比 K_{a2} 大一个数量级. 所以, H_2A 溶液的 pH 几乎完全由第一步电离所决定.

对于二元弱酸和三元弱酸的滴定和缓冲计算完全同于前面对于一元弱酸所表明的情況. 需要考虑的仅仅是使用哪一个 K_a 或 pK_a 值. 很简单, 我们使用的是描述我们正在讨论的离子间平衡的适宜常数. 例如, 图 1-4 表示用 OH^- 滴定二元弱酸的情况 ($pK_{a1}=4$, $pK_{a2}=7$). 在沿着该滴定曲线任意一点的 pH 值由下式给出:

$$\text{pH} = pK_{a1} + \log \frac{[\text{HA}^-]}{[\text{H}_2\text{A}]} \text{ 和 } \text{pH} = pK_{a2} + \log \frac{[\text{A}^{2-}]}{[\text{HA}^-]}$$

因此, 如果知道任一共轭酸-碱对的确切比值, 我们就可以算出该 pH; 或者, 如果知道了 pH, 我们就可以算出 $[\text{HA}^-]/[\text{H}_2\text{A}]$ 和 $[\text{A}^{2-}]/[\text{HA}^-]$ 的比值, 因而所有这三种组分的比值也就可以算出来了.

两性盐——多元酸的中间离子

多元酸溶于水时, 其中间离子既可象酸那样电离(反应 1), 也可象碱那样电离或

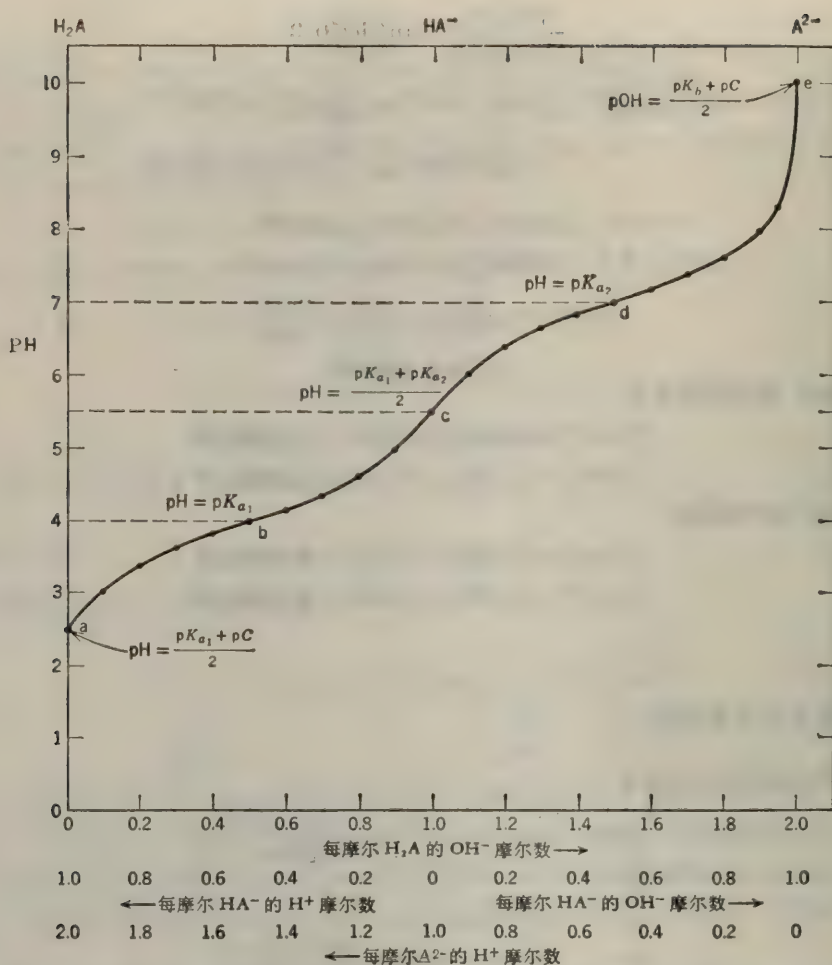


图 1-4 用强碱(如 KOH)滴定二元弱酸 H_2A 。 $pK_{a1}=4.0$; $pK_{a2}=7.0$; 开始时 $[H_2A]=0.1M$ 。

水解(反应 2)。

1. $HA^- + H_2O \rightleftharpoons A^{2-} + H_3O^+ \quad K_{\mp 1} = K_{a2}$
2. $HA^- + H_2O \rightleftharpoons H_2A + OH^- \quad K_{\mp 2} = K_{b1} = K_{b2} = \frac{K_w}{K_{a1}}$

如果反应 1 比反应 2 更易于向右进行(即,其 K_{\mp} 较大),该溶液呈酸性;如果反应 2 比反应 1 更易于向右进行,则溶液呈碱性。然而这种酸性或碱性并不象我们所能预料的即从 $K_{\mp 1}$ 和 $K_{\mp 2}$ 的相对数值所判断的那样大,这是因为发生了另外一个补偿反应。如果反应 1 比反应 2 更易于向右进行,那么所产生的某些过量 H_3O^+ 就会按反应 3 与未反应的 HA^- 反应。

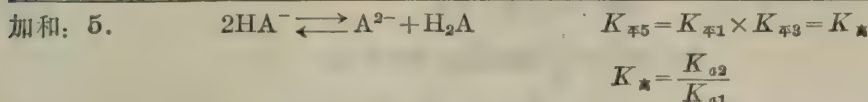
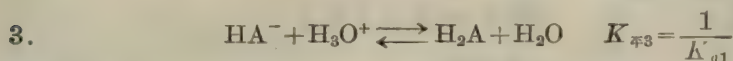
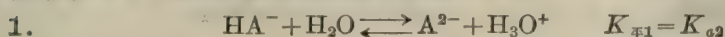
3. $HA^- + H_3O^+ \rightleftharpoons H_2A + H_2O \quad K_{\mp 3} = \frac{1}{K_{a1}}$

但是,若反应 2 比反应 1 更易于向右进行,产生的某些过量 OH^- 就会按反应 4 与 HA^- 反应。

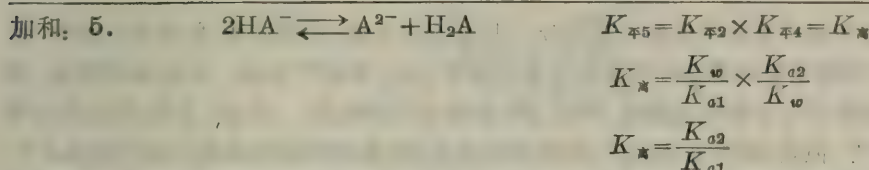
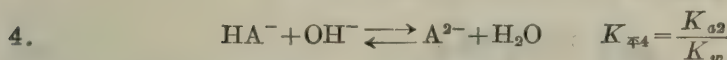
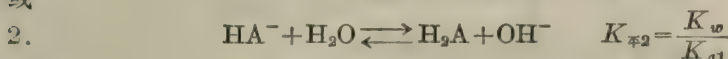
4. $HA^- + OH^- \rightleftharpoons A^{2-} + H_2O \quad K_{\mp 4} = \frac{1}{K_{a2}} = \frac{1}{K_{b1}} = \frac{K_{a2}}{K_w}$

因此,溶液中所发生的两个主要反应或为 1 加 3 或为 2 加 4。任一对反应的加和都是一样

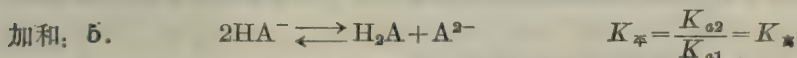
的并称之为“歧化”反应 5。歧化反应的平衡常数总是第二个酸解离常数 K_{a2} 与第一个酸解离常数 K_{a1} 之比 (K_{a2}/K_{a1})，如下所示。



或



假定一分子 HA^- 放出一个质子而另一分子 HA^- 接受一个质子，我们可以得出同样的歧化反应。



歧化反应使中间离子两侧的两类离子浓度趋于相等。在写反应式 5 时，我们假设两个组成反应进行到同样的程度（我们消去了 H_2O 和 OH^- 或者 H_2O 和 H_3O^+ ）。实际上，反应 1 或反应 2 比反应 3 或反应 4 稍易进行，这就是该溶液为什么呈酸性或呈碱性的原因。然而 OH^- 或 H_3O^+ 的实际产生量（由反应 1 或反应 2）和消耗量（由反应 3 或反应 4）要比该产生量和消耗量之差大得多。所以，我们可以安全地利用反应 5 做为计算溶液中全部离子形式（ H_2A 、 HA^- 和 A^{2-} ）浓度的基础。

于是，该溶液的 H^+ 离子浓度以及 pH 就可以从含有上述组分的 K_{\mp} 表达式计算：

$$K_{a1} = \frac{[\text{H}^+][\text{HA}^-]}{[\text{H}_2\text{A}]}, \quad K_{a2} = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^{2-}]}{[\text{HA}^-]}$$

$$K_{b2} = \frac{[\text{H}_2\text{A}][\text{OH}^-]}{[\text{HA}^-]} = \frac{K_w}{K_{a1}}, \quad K_{b1} = \frac{[\text{HA}^-][\text{OH}^-]}{[\text{A}^{2-}]} = \frac{K_w}{K_{a2}}$$

我们还可以导出两个公式，借以可直接从 K_{a2} 和 K_{a1} 值得出 H^+ 离子浓度和 pH。

$$K_{\text{歧}} = \frac{[\text{H}_2\text{A}][\text{A}^{2-}]}{[\text{HA}^-]^2} = \frac{K_{a2}}{K_{a1}}$$

$$[\text{H}_2\text{A}] = [\text{A}^{2-}]$$

$$\therefore \frac{[\text{H}_2\text{A}]^2}{[\text{HA}^-]^2} = \frac{K_{a2}}{K_{a1}} \quad \text{或} \quad \frac{[\text{H}_2\text{A}]}{[\text{HA}^-]} = \frac{\sqrt{K_{a2}}}{\sqrt{K_{a1}}}$$

将 $[\text{H}_2\text{A}]/[\text{HA}^-]$ 比值代入 K_{a1} 表达式:

$$K_{a1} = \frac{[\text{H}^+][\text{HA}^-]}{[\text{H}_2\text{A}]} \quad [\text{H}^+] = \frac{K_{a1}[\text{H}_2\text{A}]}{[\text{HA}^-]} = \frac{K_{a1}\sqrt{K_{a2}}}{\sqrt{K_{a1}}}$$

$$\frac{K_{a1}}{\sqrt{K_{a1}}} = \sqrt{K_{a1}} \quad \therefore [\text{H}^+] = \sqrt{K_{a1}} \sqrt{K_{a2}}$$

$$[\text{H}^+] = \sqrt{K_{a1}K_{a2}} \quad (36)$$

$$\log [\text{H}^+] = \frac{1}{2} (\log K_{a1} + \log K_{a2})$$

$$-\log [\text{H}^+] = -\frac{1}{2} (\log K_{a1} + \log K_{a2})$$

$$-\log [\text{H}^+] = \frac{-\log K_{a1} - \log K_{a2}}{2}$$

$$\text{pH} = \frac{\text{p}K_{a1} + \text{p}K_{a2}}{2} \quad (37)$$

中间离子是中间等当量点处的主要组分。因而在多元酸(或氨基酸)的滴定过程中,我们可以推测,中间等当量点的 pH 为该等当量点两侧 $\text{p}K_a$ 值的平均值。对氨基酸来说,如果所讨论的中间离子为不带净电荷者,则该 pH 称做 pI (等电点)。在 pI 点处,存在的主要离子形式是 AA^0 。但是,由于歧化反应,也存在少量的(而且基本是等量的) AA^{-1} 和 AA^{+1} 。如果存在的主要离子形式带有最大电荷数(不管符号如何),则该 pH 值称做 pH_m 。同样道理,我们可以指出,弱酸和弱碱盐溶液的 pH 是两个 $\text{p}K_a$ 值的平均值。例如, NH_4OAc 溶液的 pH 由下式给出:

$$\text{pH} = \frac{\text{p}K_{a\text{NH}_4^+} + \text{p}K_{a\text{HOAc}}}{2}$$

例题 1-36

写出 10 升, 0.045 M, pH 7.5 磷酸钾缓冲剂的配制方法。

解:

此缓冲剂的 pH 比 H_3PO_4 的 $\text{p}K_{a2}$ 稍高, 如图 1-5 的滴定曲线所示。所以, 存在的两种主要离子形式是 H_2PO_4^- (共轭酸) 和 HPO_4^{2-} (共轭碱), 其中以 HPO_4^{2-} 为主。

该缓冲剂可以用下列方法中的任意一种配制: (1) 将 KH_2PO_4 和 K_2HPO_4 按适当比例混合, (2) 从 H_3PO_4 出发, 通过加入适量 KOH 使之转变成 KH_2PO_4 加 K_2HPO_4 , (3) 从 KH_2PO_4 出发, 通过加入 KOH 使之一部分转变成 K_2HPO_4 , (4) 从 K_2HPO_4 出发, 通过加入强酸(如 HCl)使之一部分转变成 KH_2PO_4 , (5) 从 K_3PO_4 出发, 通过加入 HCl 使之转变成 KH_2PO_4 加 K_2HPO_4 , 和 (6) 以适当比例混合 K_3PO_4 和 KH_2PO_4 。不管用哪种方法, 第一步总是计算该缓冲剂中两类离子形式的比例和量。

该缓冲剂含磷酸盐储备量为 10 升 $\times 0.045 \text{ M} = 0.45$ 摩尔。

$$\text{pH} = \text{p}K_{a2} + \log \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

$$7.5 = 7.2 + \log \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} \quad 0.3 = \log \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

$$\frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} = \text{antilog } 0.3 = 2 = \frac{2}{1}$$

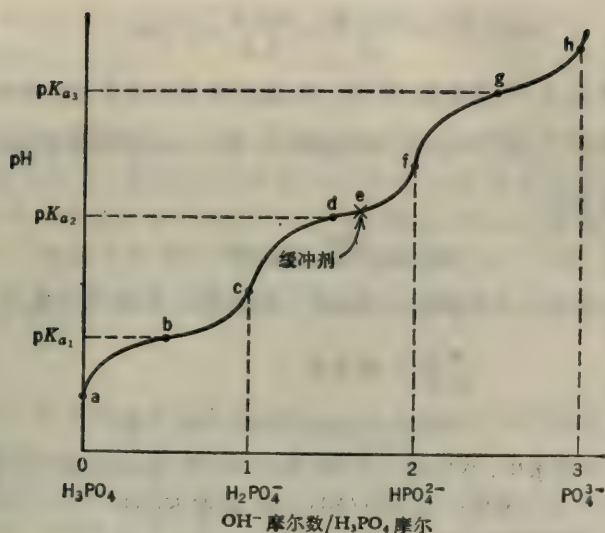
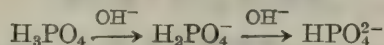


图 1-5 H_3PO_4 的滴定曲线。

\therefore 需要量为 $\frac{2}{3} \times 0.45$ 摩尔 = 0.30 摩尔 HPO_4^{2-} 和 $\frac{1}{3} \times 0.45$ 摩尔 = 0.15 摩尔 H_2PO_4^- 。

1. 用 KH_2PO_4 和 K_2HPO_4 : 称取 0.30 摩尔 K_2HPO_4 (52.8 克) 和 0.15 摩尔 KH_2PO_4 (20.4 克) 并溶于足够量水中使最终体积为 10 升。或者, 若有此二种磷酸盐储备液, 量取每种储备液的适当体积并稀释至 10 升。实际上, 我们可以制备 0.045 M 的 K_2HPO_4 和 0.045 M 的 KH_2PO_4 并将二者简单地混合, 直至 pH 为 7.5 (用 pH 计测量)。由于两种储备液都是 0.045 M, 不管每种储备液加了多大体积, 磷酸盐的总浓度将仍是 0.045 M。

2. 用 H_3PO_4 和 KOH : 从 0.45 摩尔 H_3PO_4 出发 (图 1-5 中的位点 a) 加入足够量的 KOH 以完全滴定第一个氢 (达到 c 点) 并使第二个氢被滴定 $\frac{2}{3}$ (达到 e 点)。



例如, 假设我们手头只有原储浓 H_3PO_4 (15 M) 和 1.5 M 的 KOH 标准溶液。我们需要 0.45 摩尔 H_3PO_4 。

$$\text{体积(升)} \times M = \text{摩尔数}$$

$$\text{体积(升)} \times 15 = 0.45 \text{ 摩尔}$$

$$\text{体积(升)} = \frac{0.45}{15} = 0.03 \text{ 升}$$

\therefore 取 30 毫升 H_3PO_4 , 加入 0.45 摩尔 KOH 使全部 H_3PO_4 都变成 H_2PO_4^- , 然后再加 $\frac{2}{3} \times 0.45 = 0.30$ 摩尔 KOH 使 0.3 摩尔 H_2PO_4^- 变成 HPO_4^{2-} 。换句话说, 总共需要 0.75 摩尔的 KOH 。

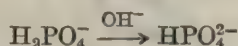
由于我们手头有 1.5 M 的 KOH , 我们可以计算需加此溶液多大体积。

$$\text{体积(升)} \times M = \text{摩尔数}$$

$$\text{体积(升)} = \frac{\text{摩尔数}}{M} = \frac{0.75}{1.5} = 0.500$$

∴ 将 500 毫升 KOH 加入 30 毫升浓 H_3PO_4 中, 然后加足水量使最终体积达到 10 升.

3. 用 KH_2PO_4 和 KOH: 我们可以从 KH_2PO_4 (c 点) 开始并加足够量的 KOH 使 $\frac{2}{3}$ 的 H_2PO_4^- 变成 HPO_4^{2-} (e 点).



例如, 假设我们手头只有固体 KH_2PO_4 和 KOH. 我们需要 0.45 摩尔的 KH_2PO_4 .

$$\frac{\text{wt}_{\text{克}}}{\text{MW}} = \text{摩尔数}$$

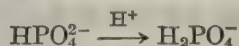
$$\text{wt}_{\text{克}} = (0.45)(136) = 61.2 \text{ 克}$$

将 KH_2PO_4 溶于少量水中, 然后加入 0.30 摩尔 KOH (固体或溶于少量水中).

$$\text{wt}_{\text{克}} = (0.30)(56) = 16.8 \text{ 克 KOH}$$

其次, 加足水量使体积达到 10 升.

4. 用 K_2HPO_4 和 HCl: 可以通过加 HCl 将 HPO_4^{2-} (f 点) 变成 H_2PO_4^- .



因为我们要最后得出的 $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 比值为 $\frac{2}{1}$, 我们只需把 $\frac{1}{3}$ 的 HPO_4^{2-} 变成 H_2PO_4^- (达到 e 点) 即可. 假设我们手头有固体 K_2HPO_4 和 2 M 的 HCl 溶液. 称取 0.45 摩尔 K_2HPO_4 .

$$\text{wt}_{\text{克}} = \text{摩尔数} \times \text{MW}$$

$$\text{wt}_{\text{克}} = (0.45)(174) = 78.3 \text{ 克}$$

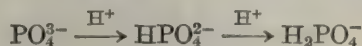
溶 KH_2PO_4 于少量水中, 然后加 $\frac{1}{3} \times 0.45 = 0.15$ 摩尔 HCl.

$$\text{体积(升)} \times M = \text{摩尔数}$$

$$\text{体积(升)} = \frac{\text{摩尔数}}{M} = \frac{0.15}{2} = 0.075 \text{ 升}$$

∴ 加 75 毫升 2 M 的 HCl. 然后加足水量使体积增至 10 升.

5. 用 K_3PO_4 和 HCl: 从 0.45 摩尔 K_3PO_4 开始 (h 点), 加足够量的 HCl 使 PO_4^{3-} 全部变成 HPO_4^{2-} (f 点). 然后再加 HCl 使 $\frac{1}{3}$ 的 HPO_4^{2-} 变成 H_2PO_4^- (e 点).



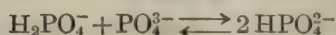
我们需要 0.45 摩尔 K_3PO_4 .

$$\text{wt}_{\text{克}} = \text{摩尔数} \times \text{MW}$$

$$\text{wt}_{\text{克}} = (0.45)(212) = 95.4 \text{ 克}$$

将 K_3PO_4 溶于水. 加 0.45 摩尔 HCl 使全部 PO_4^{3-} 都变成 HPO_4^{2-} . 再加 $\frac{1}{3} \times 0.45 = 0.15$ 摩尔 HCl 使 0.15 摩尔 HPO_4^{2-} 变成 H_2PO_4^- . 于是最终溶液含 0.15 摩尔 H_2PO_4^- 和 0.30 摩尔 HPO_4^{2-} . 然后补足水量使达 10 升.

6. 用 KH_2PO_4 和 K_3PO_4 : KH_2PO_4 和 K_3PO_4 反应生成 K_2HPO_4 . H_2PO_4^- 的作用象酸, 而 PO_4^{3-} 的作用象碱.



该反应是可逆的歧化反应. 注意, 每摩尔 H_2PO_4^- 和 PO_4^{3-} 产生 2 摩尔 HPO_4^{2-} . 于是, 要生成 0.30 摩尔 HPO_4^{2-} , 需要 0.15 摩尔 H_2PO_4^- 和 0.15 摩尔 PO_4^{3-} . 但是, 除了 0.30 摩尔 HPO_4^{2-} 外, 最终溶液含有 0.15 摩尔 H_2PO_4^- . 因此, 将 0.30 摩尔 KH_2PO_4 和 0.15 摩尔 K_3PO_4 溶于水中. 原始 0.30 摩尔 KH_2PO_4 中的 0.15 摩尔与 PO_4^{3-} 反应生成了 0.30 摩尔 HPO_4^{2-} , 剩下 0.15 摩尔 H_2PO_4^- . 然后加足水量至 10 升.

例题 1-37

计算 pH 4.59, 0.1 M 的琥珀酸盐溶液(缓冲剂)中所存在的各种琥珀酸盐离子形式的浓度.

解: 从图 1-6 中所画的滴定曲线可以看到, pH 为 4.59 时, 主要离子形式是琥珀酸 H_2 和琥珀酸 H^- , 并以后者为主. 然而, 由于 $\text{p}K_{a2}$ 与 $\text{p}K_{a1}$ 很接近, 也存在着相当量的琥珀酸 $^{2-}$.

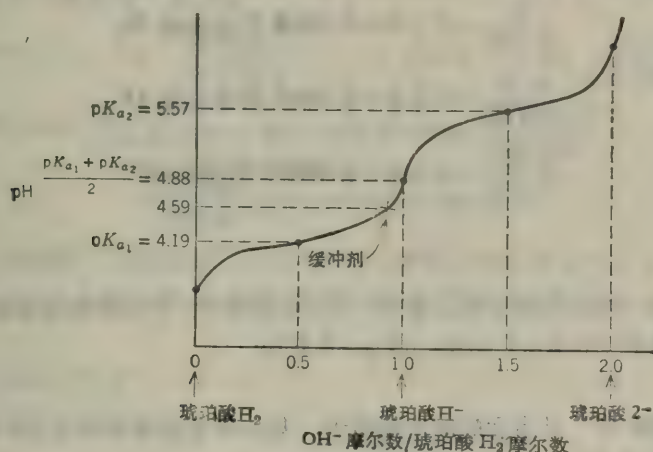


图 1-6 琥珀酸的滴定曲线.

首先利用 Henderson-Hasselbalch 方程计算琥珀酸 H^- /琥珀酸 H_2 的比值.

$$\text{pH} = \text{p}K_{a1} + \log \frac{[\text{琥珀酸 H}^-]}{[\text{琥珀酸 H}_2]}, \quad 4.59 = 4.19 + \log \frac{[\text{琥珀酸 H}^-]}{[\text{琥珀酸 H}_2]}$$

$$0.40 = \log \frac{[\text{琥珀酸 H}^-]}{[\text{琥珀酸 H}_2]}, \quad \frac{[\text{琥珀酸 H}^-]}{[\text{琥珀酸 H}_2]} = \text{antilog } 0.40 = 2.51$$

∴ 琥珀酸 H^- /琥珀酸 H_2 的比值为 2.51.

其次, 计算 pH 4.59 时琥珀酸 H^- /琥珀酸 $^{2-}$ 的比值.

$$\text{pH} = \text{p}K_{a2} + \log \frac{[\text{琥珀酸 } ^{2-}]}{[\text{琥珀酸 H}^-]}, \quad 4.59 = 5.57 + \log \frac{[\text{琥珀酸 } ^{2-}]}{[\text{琥珀酸 H}^-]}$$

$$-0.98 = \log \frac{[\text{琥珀酸 } ^{2-}]}{[\text{琥珀酸 H}^-]}, \quad \text{或} \quad +0.98 = \log \frac{[\text{琥珀酸 H}^-]}{[\text{琥珀酸 } ^{2-}]}$$

$$\frac{[\text{琥珀酸 H}^-]}{[\text{琥珀酸 } ^{2-}]} = \text{antilog } 0.98 = 9.55$$

∴ 琥珀酸 H^- /琥珀酸 $^{2-}$ 之比为 9.55:1.

三种离子的比例如下:

$$\begin{array}{ccc} \text{琥珀酸 } \text{H}_2 & & \text{琥珀酸 } \text{H}^- & & \text{琥珀酸}^{2-} \\ 1 & : & 2.51 & & \\ & & 9.55 & : & 1 \end{array}$$

表示此二比例时必须以共同组分(如琥珀酸 H^-)为基准。那么, 如果每 9.55 份琥珀酸 H^- 就有一份琥珀酸 $^{2-}$, 计算对于 2.51 份琥珀酸 H^- 应有多少份琥珀酸 $^{2-}$ 。

$$\frac{1}{9.55} = \frac{y}{2.51}, \quad 9.55y = 2.51$$

$$y = \frac{2.51}{9.55} = 0.263$$

这就是说, 这三种离子的比例为

$$\begin{array}{cccc} \text{琥珀酸 } \text{H}_2 & & \text{琥珀酸 } \text{H}^- & & \text{琥珀酸}^{2-} & & \text{总计} \\ 1 & : & 2.51 & : & 0.263 & & 3.773 \text{ 份} \end{array}$$

琥珀酸盐的总浓度是 0.1 M。

$$\frac{1}{3.773} \times 0.1 \text{ M} = 0.0265 \text{ M 琥珀酸 } \text{H}_2$$

$$\frac{2.51}{3.773} \times 0.1 \text{ M} = 0.0665 \text{ M 琥珀酸 } \text{H}^-$$

$$\frac{0.263}{3.773} \times 0.1 \text{ M} = 0.00697 \text{ M 琥珀酸}^{2-}$$

例题 1-38

(a) 0.1 M 琥珀酸一钠溶液的 pH 是多少? (b) 该溶液中, 未电离的琥珀酸、琥珀酸 H^- 和琥珀酸 $^{2-}$ 的浓度是多少 ($\text{p}K_{a1}=4.19$, $\text{p}K_{a2}=5.57$)?

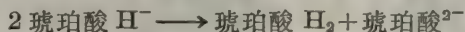
解:

琥珀酸一钠(琥珀酸 H^-) 是多元酸的中间离子。0.1 M 琥珀酸溶液的 pH 值及所有三种琥珀酸离子的浓度可计算如下。

$$(a) \quad \text{pH} = \frac{\text{p}K_{a1} + \text{p}K_{a2}}{2} = \frac{4.19 + 5.57}{2} = \frac{9.76}{2}$$

$$\text{pH} = 4.88$$

(b) 存在的全部离子形式的浓度可按二种方法计算。其一, 考虑歧化反应:



$$K_{\text{歧化}} = \frac{[\text{琥珀酸 } \text{H}_2][\text{琥珀酸}^{2-}]}{[\text{琥珀酸 } \text{H}^-]^2} = \frac{K_{a2}}{K_{a1}} = \frac{2.69 \times 10^{-6}}{6.46 \times 10^{-5}} = 4.16 \times 10^{-2}$$

令

y = 消失的琥珀酸 H^- 的 M

$$\therefore \frac{y}{2} = \text{产生的琥珀酸 } \text{H}_2 \text{ 的 M}$$

而且

$$\frac{y}{2} = \text{产生的琥珀酸}^{2-} \text{ 的 M}$$

$$\frac{(y/2)(y/2)}{(0.1-y)^2} = 4.16 \times 10^{-2}, \quad \sqrt{\frac{y^2}{4(0.1-y)^2}} = \sqrt{4.16 \times 10^{-2}}$$

$$\frac{y}{2(0.1-y)} = 2.04 \times 10^{-1}, \quad \frac{y}{(0.2-2y)} = 0.204$$

$$y = 0.0408 - 0.408y, \quad 1.408y = 0.0408$$

$$y = \frac{0.0408}{1.408} = 0.0290, \quad \frac{y}{2} = 0.0145$$

$$\text{琥珀酸 } H_2 = 0.0145 M$$

$$\text{琥珀酸 } ^{2-} = 0.0145 M$$

$$\text{琥珀酸 } H^- = 0.100 - 0.029 = 0.071 M$$

其二, 这些浓度可借 Henderson-Hasselbalch 方程算出:

$$pH = pK_{a1} + \log \frac{[\text{琥珀酸 } H^-]}{[\text{琥珀酸 } H_2]}, \quad 4.88 = 4.19 + \log \frac{[\text{琥珀酸 } H^-]}{[\text{琥珀酸 } H_2]}$$

$$0.69 = \log \frac{[\text{琥珀酸 } H^-]}{[\text{琥珀酸 } H_2]}, \quad \frac{[\text{琥珀酸 } H^-]}{[\text{琥珀酸 } H_2]} = \text{antilog } 0.69 = 4.9$$

∴ 琥珀酸 H^- /琥珀酸 H_2 之比为 4.9:1.

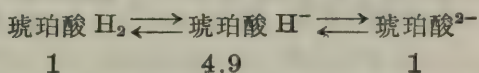
接着计算琥珀酸 H^- /琥珀酸 $^{2-}$ 的比值.

$$pH = pK_{a2} + \log \frac{[\text{琥珀酸 } ^{2-}]}{[\text{琥珀酸 } H^-]}, \quad 4.88 = 5.57 + \log \frac{[\text{琥珀酸 } ^{2-}]}{[\text{琥珀酸 } H^-]}$$

$$-0.69 = \log \frac{[\text{琥珀酸 } ^{2-}]}{[\text{琥珀酸 } H^-]} \quad \text{或} \quad +0.69 = \log \frac{[\text{琥珀酸 } H^-]}{[\text{琥珀酸 } ^{2-}]}$$

$$\frac{[\text{琥珀酸 } H^-]}{[\text{琥珀酸 } ^{2-}]} = \text{antilog } 0.69 = 4.9$$

∴ 琥珀酸 H^- /琥珀酸 $^{2-}$ 之比也是 4.9:1. 所有三种离子的浓度比为 1:4.9:1.



琥珀酸盐的总浓度是 0.1 M.

$$\frac{1}{6.9} \times 0.1 M = \text{琥珀酸 } H_2 \text{ 的浓度}$$

$$\frac{4.9}{6.9} \times 0.1 M = \text{琥珀酸 } H^- \text{ 的浓度}$$

$$\frac{1}{6.9} \times 0.1 M = \text{琥珀酸 } ^{2-} \text{ 的浓度}$$

$$\therefore [\text{琥珀酸 } H_2] = 0.0145 M$$

$$[\text{琥珀酸 } H^-] = 0.0710 M$$

$$[\text{琥珀酸 } ^{2-}] = 0.0145 M$$

缓冲剂的稀释

例题 1-39

根据 Henderson-Hasselbalch 方程, 缓冲剂的 pH 仅仅取决于共轭碱与共轭酸的活度比. 那么, 解释一下, 为什么缓冲剂被稀释时 pH 发生变化.

解:

缓冲剂 pH 随稀释而变化有几方面原因:

1. 活度系数的改变: 不同离子的活度系数在任一给定浓度下是不相同的, 而且它们并不按同样方式随给定浓度变化而改变。例如, 我们从附录 V 可以看到, $\gamma_{\text{HPO}_4^{2-}}$ 在 $0.1 M$ 溶液中是 0.445, 而在 $0.001 M$ 溶液中是 0.903。其共轭酸的活度系数 ($\gamma_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}$) 在 $0.1 M$ 溶液中是 0.744, 而在 $0.001 M$ 溶液中是 0.928。一般说来, 稀释的结果是 γ 的增大; 在无限稀释时, γ 接近 1。对于给定的浓度变化, 离子荷电越多, 其活度系数的变化就越大。今有一含相等摩尔 HPO_4^{2-} 和 H_2PO_4^- 的“ $0.2 M$ 磷酸盐缓冲剂”(每种离子形式为 $0.1 M$)。将这两种离子的活度系数考虑进去就可以算出该溶液的准确 pH 值。将其活度系数的变化考虑进去, 我们还可以算出稀释 100 倍后该溶液的 pH 值。

$$\text{pH} = \text{p}K_{a2} + \log \frac{a_{\text{HPO}_4^{2-}}}{a_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}} = \text{p}K_{a2} + \log \frac{\gamma_{\text{HPO}_4^{2-}}[\text{HPO}_4^{2-}]}{\gamma_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

<p><u>0.2 M 缓冲剂</u></p> $\begin{aligned} \text{pH} &= 7.2 + \log \frac{(0.445)(0.1)}{(0.744)(0.1)} \\ &= 7.2 + \log 0.598 \\ &= 7.2 - 0.22 \\ \text{pH} &= 6.98 \end{aligned}$		<p><u>0.002 M 缓冲剂</u></p> $\begin{aligned} \text{pH} &= 7.2 + \log \frac{(0.903)(0.001)}{(0.928)(0.001)} \\ &= 7.2 + \log 0.973 \\ &= 7.2 - 0.01 \\ \text{pH} &= 7.19 \end{aligned}$
--	--	--

一般地说, “酸性”缓冲剂被稀释以后 $\log a_{\text{A}^-}/a_{\text{HA}}$ 项增大, 导致 pH 升高。至于“碱性”缓冲剂, 稀释后 $\log a_{\text{R}-\text{NH}_2}/a_{\text{R}-\text{NH}_3^+}$ 项减小, 结果是 pH 降低。

2. HA 解离度的变化: 如前所示, 弱酸的解离度随溶液的稀释而加大。在弱酸单独存在的溶液中(没有添加的共轭碱), 当 $[\text{HA}]_{\text{始}} = 100K_a$ 时该酸解离 10%, 而当 $[\text{HA}]_{\text{始}} = 2K_a$ 时, 则解离 50%。因此, $\log \text{A}^-/\text{HA}$ 项随溶液的稀释而增大。在缓冲剂溶液中(弱酸和添加的共轭碱), A^- 有助于降低 HA 的解离作用。所以, 在 $[\text{HA}] = 2K_a$ 的缓冲剂溶液中, HA 的解离略低于 50%。

例如, 今有一 $0.02 M$ 琥珀酸盐缓冲剂, 由 0.01 摩尔琥珀酸和 0.01 摩尔琥珀酸一钠溶解在足量水中使总体积为 1 升而制成。琥珀酸一钠完全电离, 琥珀酸部分电离。令

y = 解离琥珀酸的 M

$\therefore y$ = 解离后所产生 H^+ 的 M

并

y = 该酸解离后所产生 HA^- 的 M

$$\therefore [\text{HA}^-] = 0.01 + y, \quad [\text{H}_2\text{A}] = 0.01 - y \quad \text{且} \quad [\text{H}^+] = y$$

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{HA}^-]}{[\text{H}_2\text{A}]} = \frac{(y)(0.01+y)}{(0.01-y)} = 6.46 \times 10^{-5}$$

由于 H_2A 和 HA^- 的浓度比大于 K_{a1} 值的 100 倍, y 与 0.01 比较起来很小, 可忽略不计。

$$\therefore [\text{H}^+] = K_{a1}, \quad \text{pH} = \text{p}K_{a1} = 4.19$$

现在, 让我们将上述缓冲剂稀释 100 倍。

$$[\text{HA}^-] = 10^{-4} + y, \quad [\text{H}_2\text{A}] = 10^{-4} - y \quad \text{且} \quad [\text{H}^+] = y$$

既然缓冲剂组分的浓度与 K_a 值具有同样的数量级, 因而 H_2A 的解离大于 10%, 而 y 与 10^{-4} 比较起来并不小。所以, 我们必须求出 y 的准确值。

$$K_a = \frac{(y)(10^{-4}+y)}{(10^{-4}-y)} = 6.46 \times 10^{-5}$$

$$6.46 \times 10^{-9} - 6.46 \times 10^{-5}y = 10^{-4}y + y^2$$

$$y^2 + 10 \times 10^{-5}y + 6.46 \times 10^{-5}y - 6.46 \times 10^{-9} = 0$$

$$y^2 + 16.46 \times 10^{-5}y - 6.46 \times 10^{-9} = 0$$

$$y = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

式中, $a=1$, $b=16.46 \times 10^{-5}$, $c=-6.46 \times 10^{-9}$.

$$y = \frac{-16.46 \times 10^{-5} \pm \sqrt{(16.46 \times 10^{-5})^2 - 4(-6.46 \times 10^{-9})}}{2}$$

$$y = \frac{-16.46 \times 10^{-5} \pm \sqrt{271 \times 10^{-10} + 258 \times 10^{-10}}}{2}$$

$$y = \frac{-16.46 \times 10^{-5} \pm \sqrt{529 \times 10^{-10}}}{2}$$

$$y = \frac{-16.46 \times 10^{-5} \pm 23.0 \times 10^{-5}}{2} = \frac{6.54 \times 10^{-5}}{2}$$

$$y = 3.27 \times 10^{-5}$$

$$[H^+] = 3.27 \times 10^{-5} M \quad \therefore \text{pH} = 4.49$$

$$[H_2A] = (10 \times 10^{-5}) - (3.27 \times 10^{-5}) = 6.73 \times 10^{-5} M$$

$$[HA^-] = (10 \times 10^{-5}) + (3.27 \times 10^{-5}) = 13.27 \times 10^{-5} M$$

注意, 当 $10^{-2} M$ 缓冲剂被稀释 100 倍时, 其本来为 1 的 $[HA^-]/[H_2A]$ 比变为 2 左右。

3. 最后, 若由于缓冲剂被大量稀释, 它对溶液中的 H^+ 或 OH^- 离子浓度所起的作用与水接近, 并且 pH 接近于 7。

例题 1-40

假定你配制了一个缓冲剂, 其中每升溶有 0.10 摩尔弱酸 HA 和 0.10 摩尔该弱酸的钠盐 A^- 。设 $pK_a=3$ 。(a) 该缓冲剂的 pH 是多少? (b) 要把 pH 提高 1 单位必须将该缓冲剂稀释多少倍? 忽略活度系数的变化。

解:

(a) 令

$y = \text{解离 HA 的 } M$

$$\therefore [HA] = 0.10 - y, \quad [A^-] = 0.10 + y \text{ 且 } [H^+] = y$$

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = \frac{(y)(0.10 + y)}{(0.10 - y)} = 10^{-3}$$

由于 HA 和 A^- 的浓度比 K_a 大得多, y 很小, 在 HA 和 A^- 项中可略去。

$$K_a = \frac{(y)(0.10)}{(0.10)} = 10^{-3}$$

$$y = 10^{-3} = [H^+]$$

$$\text{pH} = 3$$

(b) 如果稀释后 pH 增加 1 单位(到 pH 4), 那么 $[H^+] = 10^{-4} M = y$ 。计算我们必须重新配制(或稀释原始浓度后达到)的 HA 和 A^- 新“原始”浓度, 以便当加、减 y 时(即 HA 解离时), A^-/HA 之比为 10:1。

令 $C = HA$ 和 A^- 的新“原始” M 。

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}, \quad 10^{-3} = \frac{(10^{-4})(C+10^{-4})}{(C-10^{-4})}$$

$$10^{-3}C - 10^{-7} = 10^{-4}C + 10^{-8}$$

$$0.9 \times 10^{-3}C = 1.1 \times 10^{-7}$$

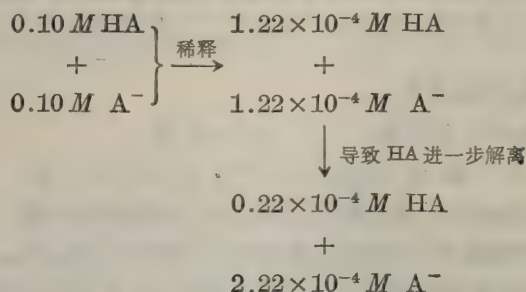
$$C = \frac{1.1 \times 10^{-7}}{0.9 \times 10^{-3}} = 1.22 \times 10^{-4}$$

换句话说, 如果我们从溶解 HA 和 A^- 每升各 1.22×10^{-4} 摩尔出发, 则 $1 \times 10^{-4} M$ 的 HA 解离, 产生 $2.22 \times 10^{-4} M$ 的 A^- , 并余下 $0.22 \times 10^{-4} M$ 的 HA.

验算:

$$10^{-3} = \frac{(10^{-4})(2.22 \times 10^{-4})}{(0.22 \times 10^{-4})} = (10^{-4})(10)$$

将 $0.2 M$ 缓冲剂稀释至上述新浓度, 我们会得到完全相同的结果。



\therefore 该原始缓冲剂必须稀释 820 倍。

$$\frac{1}{820} \times 0.10 M = 1.22 \times 10^{-4} M$$

一般法则

作为求解缓冲剂习题的一般法则, 我们可以假定: 存在于溶液中的共轭酸加共轭碱的浓度等于加到溶液中每种物质的原始浓度(或由部分滴定其中任意一种物质所产生的浓度)。该法则不适用于极稀的缓冲剂(当缓冲组分浓度接近 K_a 值时)。在这样稀的缓冲剂中, y 的变化与原始浓度相比是较大的。

总离子强度的校正

离子(除了缓冲组分的离子之外)会影响离子强度和缓冲组分的活度系数。因此, 如果溶液中 NaCl 的浓度较大, 即使是含有等摩尔浓度 HPO_4^{2-} 和 $H_2PO_4^-$ 的很稀溶液, pH 也不会等于 pK_a 。比较简便的做法是不必为总离子强度校正缓冲组分的活度系数, 而是定义一个新的表观或有效 pK'_a , 而使给定总离子强度下的 pH (即 $-\log a_{H^+}$) 与缓冲组分的实际浓度相联系。该表观 pK'_a 可表示为 pK'_a 。

$$K'_a = \frac{a_{H^+}[A^-]}{[HA]} \quad \text{和} \quad pH = pK'_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (38)$$

根据 Debye-Hückel 方程可定量地推测总离子强度对于 K_a 或 pK_a 的影响。于是, 在任意总离子强度下, 有效的 pK_a 可以写成

$$pK'_a = pK_a + \Delta pK_a \quad (39)$$

附录 VI 列出了三种不同总离子强度下的 ΔpK_a 值。

例题 1-41

某含 $0.01 M K_2HPO_4$ 和 $0.01 M KH_2PO_4$ 的 $0.05 M KCl$ 溶液, 其 pH 是多少?

解:

尽管 $[HPO_4^{2-}] = [H_2PO_4^-]$, 其 pH 并不是 7.2。如果我们校正 HPO_4^{2-} 和 $H_2PO_4^-$ 的活度系数, 仍然不会得到正确的 pH。我们必须校正总离子强度, 其中一部分是由 KCl 引起的。首先计算这个离子强度。溶液中含有 $0.01 M HPO_4^{2-} + 0.01 M H_2PO_4^- + 0.05 M Cl^- + 0.08 M K^+$ (每有一个 $H_2PO_4^-$ 和 Cl^- , 则有一个 K^+ ; 每有一个 HPO_4^{2-} , 则有两个 K^+)。

$$\begin{aligned}\frac{I}{2} &= \frac{[HPO_4^{2-}](2)^2 + [H_2PO_4^-](1)^2 + [Cl^-](1)^2 + [K^+](1)^2}{2} \\ &= \frac{(0.01)(2)^2 + (0.01)(1) + (0.05)(1) + (0.08)(1)}{2} \\ &= \frac{0.18}{2} = 0.09\end{aligned}$$

从附录 VI 我们看到, 在 ~ 0.10 的离子强度下, 带 -1 电荷的共轭酸, 其 ΔpK_a 为 -0.32 。

$$pK'_a = pK_a + \Delta pK_a, \quad pK'_a = 7.2 + (-0.32)$$

$$pK'_a = 6.88$$

因为 $[HPO_4^{2-}] = [H_2PO_4^-]$, $pH = pK'_a$ 。

$$pH = 6.88$$

离子强度恒定的缓冲剂

为了确定 pH 对某个反应的影响, 必须确实知道所用的一切缓冲剂都有相同的离子强度 (除非离子强度的变化确实无影响)。通常被忽视的事实是: (a) 任一给定组成的缓冲剂, 在不同 pH 值条件下具有不同的离子强度; (b) 两个不同组成的缓冲剂, 在相同的 pH 条件下, 可能有不同的离子强度。对于一系列不同离子强度的缓冲剂, 最简单的处理方法是, 确定哪种缓冲剂的离子强度最大, 然后将无抑制作用的中性盐如 KCl 加入所有其它缓冲剂中, 使它们的离子强度达到那个最大值。

例题 1-42

(a) 下列缓冲剂的离子强度哪个最大: pH 7.5 的 $0.05 M$ Tris 缓冲剂或 pH 7.5 的 $0.05 M$ 磷酸盐缓冲剂? (b) 怎样可使它们的离子强度相等?

解:

(a) Tris 缓冲剂含有 $Tris^0$ 、 $Tris^+$ 和平衡离子, 如 Cl^- (该缓冲剂也许是用 HCl 滴定 $Tris^0$ 所成)。 $Tris^0$ 无电荷, 因而对离子强度无影响。 H^+ 和 OH^- 浓度非常低, 因而也可忽略。如果我们还记得使 pH 达到 7.5 时的 HCl 加入量, 自然就会知道 $Tris^+$ 的浓度。否则, 我们可以计算 $[Tris^+]$:

$$pH = pK_a + \log \frac{[Tris^0]}{[Tris^+]}, \quad 7.5 = 8.1 + \log \frac{[Tris^0]}{[Tris^+]}$$

$$-0.6 = \log \frac{[\text{Tris}^0]}{[\text{Tris}^+]}, \quad [\text{Tris}^+] = \frac{4}{5} \times 0.05 M = 0.04 M$$

$$\therefore [\text{Cl}^-] = 0.04 M$$

更准确的计算应当把 γ_{Tris^+} 包括进去(在 $0.05 M$ 附近, 对于一价正离子, 其值约为 0.9).

磷酸盐缓冲剂含有 H_2PO_4^- 、 HPO_4^{2-} 和平衡离子, 如 K^+ . pH 在 $\text{p}K_{a2}$ 附近. 因此, 溶液中每种磷酸盐形式的浓度大约是 $0.025 M$ (如果该缓冲剂为我们所自制, 我们就会知道 HPO_4^{2-} 和 H_2PO_4^- 的准确量). 在 $0.025 M$ 附近, HPO_4^{2-} 和 H_2PO_4^- 的活度系数分别是 0.64 和 0.88 (据附录 V 所列数值的半对数作图算得).

$$\text{pH} = \text{p}K_{a2} + \log \frac{\gamma_{\text{HPO}_4^{2-}} [\text{HPO}_4^{2-}]}{\gamma_{\text{H}_2\text{PO}_4^-} [\text{H}_2\text{PO}_4^-]}, \quad 7.5 = 7.2 + \log \frac{0.64 [\text{HPO}_4^{2-}]}{0.88 [\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

$$0.3 = \log \frac{0.64 [\text{HPO}_4^{2-}]}{0.88 [\text{H}_2\text{PO}_4^-]} \quad \therefore \frac{0.64 [\text{HPO}_4^{2-}]}{0.88 [\text{H}_2\text{PO}_4^-]} = \frac{2}{1}$$

$$\frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} = \frac{(2)(0.88)}{(1)(0.64)} = \frac{2.75}{1}$$

$$\therefore [\text{HPO}_4^{2-}] = \frac{2.75}{3.75} \times 0.05 = 0.037 M$$

$$[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = \frac{1}{3.75} \times 0.05 = 0.013 M$$

该磷酸盐缓冲剂含有 $0.037 M \text{HPO}_4^{2-}$ 、 $0.013 M \text{H}_2\text{PO}_4^-$ 和 $(0.037)(2) + (0.013)(1) = 0.087 M \text{K}^+$.

这两种缓冲剂的离子强度是

$$\text{Tris:} \quad \frac{I}{2} = \frac{[\text{Tris}^+](1)^2 + [\text{Cl}^-](1)^2}{2} = \frac{0.04 + 0.04}{2}$$

$$\frac{I}{2} = 0.04$$

$$\begin{aligned} \text{磷酸盐:} \quad \frac{I}{2} &= \frac{[\text{HPO}_4^{2-}](2)^2 + [\text{H}_2\text{PO}_4^-](1)^2 + [\text{K}^+](1)^2}{2} \\ &= \frac{(0.037)(4) + (0.013)(1) + (0.087)(1)}{2} = \frac{0.248}{2} \end{aligned}$$

$$\frac{I}{2} = 0.124$$

于是, pH 为 7.5 时, $0.05 M$ 磷酸盐缓冲剂的离子强度大约是 $0.05 M \text{Tris}$ 缓冲剂的三倍.

(b) 加 $0.124 - 0.04 = 0.084 M \text{KCl}$ 于 Tris 缓冲剂中可使其离子强度达到 0.124 (当离子强度从 0.04 调到 0.124 时, pH 可能稍有变化).

E. 氨基酸和肽

常见的氨基酸就是多元弱酸. pH 、缓冲剂的配制和容量等等的计算完全可按前面几节所示方法进行. 中性氨基酸(如甘氨酸、丙氨酸、苏氨酸)可做二元酸处理(表 1-1). 酸性氨基酸(如天冬氨酸、谷氨酸)和碱性氨基酸(如赖氨酸、组氨酸、精氨酸)可做三元酸处理, 正象以前处理磷酸那样.

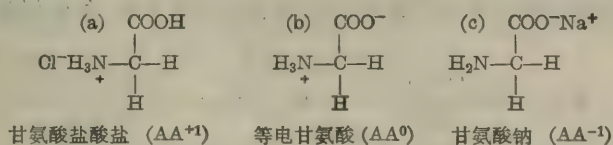
表 1-1 在二元弱酸滴定曲线的关键点, 主要离子形式和 pH

开 始	$\text{p}K_{a1}$ (第一等当量半途点)	第一等当量点	$\text{p}K_{a2}$ (第二等当量半途点)	第二等当量点
H_2A	50% H_2A 50% HA^-	HA^-	50% HA^- 50% A^{2-}	A^{2-}
$\text{H}_2\text{CO}_3(\text{CO}_2)$	50% $\text{H}_2\text{CO}_3 + \text{CO}_2$ 50% HCO_3^-	HCO_3^-	50% HCO_3^- 50% CO_3^{2-}	CO_3^{2-}
$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$	50% $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$ 50% $^-\text{OOC}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$	$^-\text{OOC}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$	50% $^-\text{OOC}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$ 50% $^-\text{OOC}-(\text{CH}_2)_2-\text{COO}^-$	$^-\text{OOC}-(\text{CH}_2)_2-\text{COO}^-$
$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CHR}-\text{COOH}$	50% $\text{H}_3\text{N}^+-\text{CHR}-\text{COOH}$ 50% $\text{H}_3\text{N}^+-\text{CHR}-\text{COO}^-$	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CHR}-\text{COO}^-$ ($\text{pH}=\text{pI}$)	50% $\text{H}_3\text{N}^+-\text{CHR}-\text{COO}^-$ 50% $\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{COO}^-$	$\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{COO}^-$
$\text{H}_3\text{N}^+-\text{R}-\text{NH}_3^+$	50% $\text{H}_3\text{N}^+-\text{R}-\text{NH}_3^+$ 50% $\text{H}_3\text{N}^+-\text{R}-\text{NH}_2$	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{R}-\text{NH}_2$	50% $\text{H}_3\text{N}^+-\text{R}-\text{NH}_2$ 50% $\text{H}_2\text{N}-\text{R}-\text{NH}_2$	$\text{H}_2\text{N}-\text{R}-\text{NH}_2$
$\text{pH} \approx \frac{\text{p}K_{a1} + \text{p}[\text{浓度}]}{2}$	$\text{pH} = \text{p}K_{a1}$	$\text{pH} = \frac{\text{p}K_{a1} + \text{p}K_{a2}}{2}$	$\text{pH} = \text{p}K_{a2}$	$\text{pOH} \approx \frac{\text{p}K_{a2} + \text{p}[\text{浓度}]}{2}$ $\text{pH} = 14 - \text{pOH}$

例题 1-43

“甘氨酸”可以三种形式存在: (a) 甘氨酸盐酸盐, (b) 等电甘氨酸(有时称为甘氨酸, 自由碱), 和(c)甘氨酸钠。画出这三种形式的结构。

解:

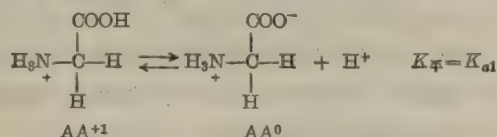


例题 1-44

计算下列物质 0.1 M 溶液的 pH: (a) 甘氨酸盐酸盐, (b) 等电甘氨酸, 和(c) 甘氨酸钠。

解:

(a) 甘氨酸盐酸盐实为二元酸。由于羧基的酸性($K_{a1} = 4.57 \times 10^{-3}$, $\text{p}K_{a1} = 2.34$)比荷电的氨基($\text{p}K_{a2} = 9.6$)强得多, 其溶液的 pH 几乎完全决定于羧基解离程度。



$$K_{a1} = \frac{[\text{AA}^0][\text{H}^+]}{[\text{AA}^{+1}]}$$

y = 解离的 AA^{+1} M

令

且
而

$$\therefore y = \text{生成的 } H^+ M$$

$$y = \text{生成的 } AA^0 M$$

$$0.1 - y = \text{平衡时保留下来的 } AA^{+1} M$$

$$K_{a1} = \frac{(y)(y)}{(0.1 - y)} = 4.57 \times 10^{-3}$$

由于羧基接近氨基, 该羧基酸性比醋酸羧基强。分母中的 y 不能略去。

$$4.57 \times 10^{-4} - 4.57 \times 10^{-3} y = y^2$$

$$y^2 + 4.57 \times 10^{-3} y - 4.57 \times 10^{-4} = 0$$

$$y = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

式中, $a=1$, $b=4.57 \times 10^{-3}$, $c=-4.57 \times 10^{-4}$ 。

解 y , 我们得到

$$[H^+] = 1.92 \times 10^{-3} M \quad pH = 1.72$$

因此, 甘氨酸盐酸盐在 $0.1 M$ 溶液中解离 19.2%。

(b) 等电甘氨酸是多元酸的中间离子。

中间离子溶液的 pH 基本上与该离子浓度无关。其 pH 可从该离子两侧的 pK_a 值计算出来, 即可以从后面跟着发生解离作用的酸性基 pK_a 和前面已经解离的酸性基 pK_a 计算出来。

$$pH = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2} = \frac{2.34 + 9.6}{2} = \frac{11.94}{2}$$

$$pH = 5.97$$

在这一点, 观察为什么 pH 是 pK_{a2} 和 pK_{a1} 的平均值是很容易的。pI 定义为主要离子形式为 AA^0 时溶液的 pH, 而且存在的任何微小浓度的 AA^+ 都由相等浓度的 AA^- 所抵消。我们知道

$$K_{a1} = \frac{[AA^0][H^+]}{[AA^+]}, \quad \text{和} \quad K_{a2} = \frac{[AA^-][H^+]}{[AA^0]}$$

$$\therefore [AA^0] = \frac{K_{a1}[AA^+]}{[H^+]} \quad \text{和} \quad [H^+] = \frac{K_{a2}[AA^0]}{[AA^-]}$$

将 $[AA^0]$ 代入:

$$[H^+] = \frac{K_{a2} K_{a1} [AA^+]}{[AA^-][H^+]} \quad \text{或} \quad [H^+]^2 = \frac{K_{a2} K_{a1} [AA^+]}{[AA^-]}$$

但

$$[AA^+] = [AA^-]$$

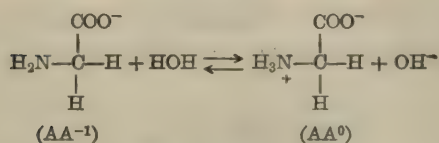
$$\therefore [H^+] = \sqrt{K_{a2} K_{a1}} \quad \text{和} \quad pH = \frac{pK_{a2} + pK_{a1}}{2} \quad (40)$$

(c) 甘氨酸钠是二元碱。未解离的氨基和羧酸离子都可接受水的一个质子。但是, 由于氨基的碱性比羧酸离子强得多, 溶液的 pH 几乎完全决定于氨基的解离程度。我们可以通过计算每个基团的 K_b 值来检查碱的相对强度。对于氨基,

$$K_{b1} = \frac{K_w}{K_{a2}} = \frac{10^{-14}}{10^{-9.6}} = 10^{-4.4} = 3.98 \times 10^{-5}$$

对于羧酸离子,

$$K_{b2} = \frac{K_w}{K_{a1}} = \frac{10^{-14}}{10^{-2.34}} = 10^{-11.66} = 2.19 \times 10^{-12}$$



$$K_{b1} = \frac{[\text{OH}^-][\text{AA}^0]}{[\text{AA}^{-1}]} = \frac{(y)(y)}{(0.1-y)}$$

由于甘氨酸钠的浓度与 K_{b1} 比较是大的, 我们可以把 y 从分母中略去。

$$3.98 \times 10^{-5} = \frac{y^2}{0.1}, \quad y^2 = 3.98 \times 10^{-6}$$

$$y = \sqrt{3.98 \times 10^{-6}} = 1.995 \times 10^{-3}$$

$$[\text{OH}^-] = 1.995 \times 10^{-3} \text{ M} \approx 2 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$[\text{H}^+] = \frac{K_w}{[\text{OH}^-]} = \frac{1 \times 10^{-14}}{2 \times 10^{-3}} = 5 \times 10^{-12}$$

$$\text{pH} = \log \frac{1}{[\text{H}^+]} = \log \frac{1}{5 \times 10^{-12}} = \log 2 \times 10^{11}$$

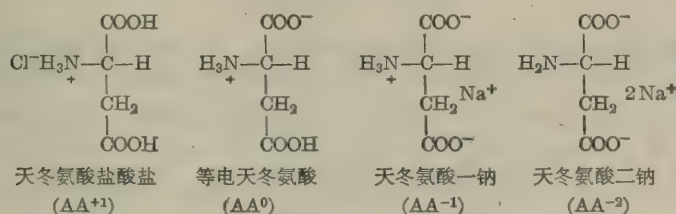
$$\text{pH} = 11.3$$

例题 1-45

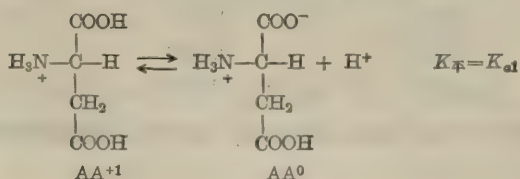
(a) 绘出可能有的各种形式的天冬氨酸结构。(b)–(e)说明每种形式在水中的电离情况。

解:

(a) “天冬氨酸”可有四种形式: 天冬氨酸盐酸盐(AA^{+1})、等电天冬氨酸(AA^0)、天冬氨酸一钠(AA^{-1})和天冬氨酸二钠(AA^{-2})。其结构如下所示:



(b) 天冬氨酸盐酸盐以典型多元酸的方式电离。三个酸性基的 $\text{p}K_a$ 值是 2.1($\alpha\text{-COOH}$)、3.86($\beta\text{-COOH}$)和 9.82($\alpha\text{-NH}_3^+$)。由于 $\alpha\text{-COOH}$ 的酸性比其它两个基团大得多, 所以天冬氨酸盐酸盐溶液的 pH 几乎完全决定于天冬氨酸盐酸盐的浓度以及 $\alpha\text{-COOH}$ 的电离程度。



pH 的计算可完全按上题针对甘氨酸盐酸盐所介绍的方法进行。

$$K_{a1} = \frac{[AA^0][H^+]}{[AA^{+1}]}$$

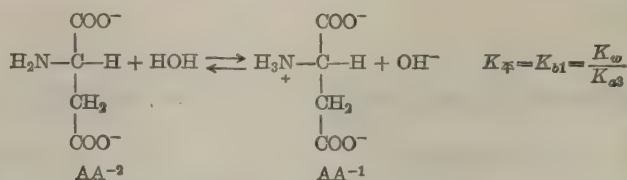
(c) 天冬氨酸二钠以典型多元碱的方式电离。三个碱性基的 pK_b 值可分别从表 1-2 所列 pK_a 值算出。

$$pK_b = 14 - pK_a$$

表 1-2

共轭酸	pK_a	共轭碱	pK_b
$\alpha\text{-COOH}$	2.1 (pK_{a1})	$\alpha\text{-COO}^-$	11.9 (pK_{b3})
$\beta\text{-COOH}$	3.86 (pK_{a2})	$\beta\text{-COO}^-$	10.14 (pK_{b2})
$\alpha\text{-NH}_3^+$	9.82 (pK_{a3})	$\alpha\text{-NH}_2$	4.18 (pK_{b1})

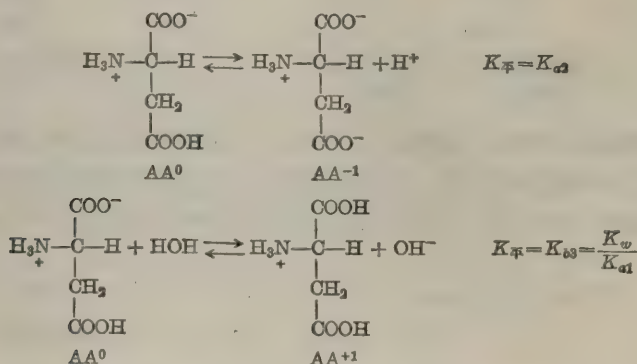
注意, 共轭酸的 pK_a 值是按酸性强度降低的顺序编号的。 pK_b 值是按碱性强度降低的顺序编号的。因此, $\alpha\text{-NH}_3^+$ 是最弱的酸性基团, 其 pK_a 值记为 pK_{a3} 。 $\alpha\text{-NH}_3^+$ 的共轭碱是 $\alpha\text{-NH}_2$, 它是这些碱性基团中最强的一个。所以, 其 pK_b 值记为 pK_{b1} 。由于 pK_{b2} 几乎比 pK_{b1} 小 6 个 pH 单位 (K_{b2} 几乎比 K_{b1} 小 10^6 倍), 天冬氨酸二钠溶液的 pH 几乎完全决定于该盐的浓度及 $\alpha\text{-NH}_2$ 的电离程度。



pH 的计算完全可按上题中针对甘氨酸二钠所介绍的方法进行。

$$K_{b1} = \frac{[AA^{-1}][OH^-]}{[AA^{-2}]}$$

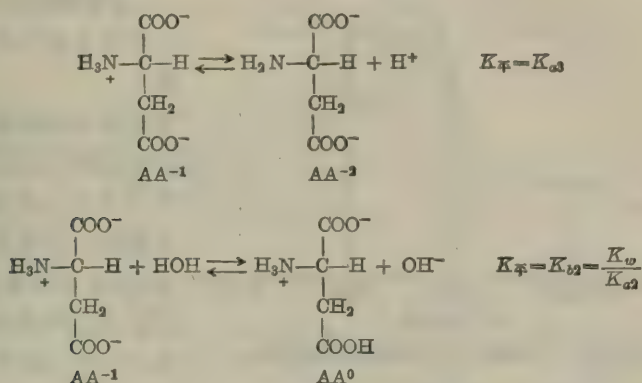
(d) 天冬氨酸的其余二种形式是多元酸的中间离子。以等电天冬氨酸为例, 该化合物电离时既象酸又象碱。



等电天冬氨酸溶液的 pH 可从 pK_{a1} 和 pK_{a2} 值 (即在滴定曲线图中等电天冬氨酸两侧的 pK_a 值) 计算。

$$\text{pH} = \frac{\text{p}K_{a1} + \text{p}K_{a2}}{2} = \frac{2.1 + 3.86}{2} = \frac{5.96}{2} = 2.98$$

(e) 剩下的形式——天冬氨酸一钠，也是多元酸的中间离子。其电离作用既象酸又象碱，如下所示：



所示的象酸一样电离的基团($\alpha\text{-NH}_3^+$)是唯一剩下的酸性基团。所示的象碱一样电离的基团($\beta\text{-COO}^-$ 基团)是仅有的两个碱性基团中较强的一个。作为一个碱, $\alpha\text{-COO}^-$ 基团的电离作用对于规定该溶液 pH 所起的作用很小,因为它的碱性比 $\beta\text{-COO}^-$ 基团弱得多。天冬氨酸一钠溶液的 pH 可从 $\text{p}K_{a2}$ 和 $\text{p}K_{a3}$ 值计算。

$$\text{pH} = \frac{\text{p}K_{a2} + \text{p}K_{a3}}{2} = \frac{3.86 + 9.82}{2} = \frac{13.68}{2} = 6.84$$

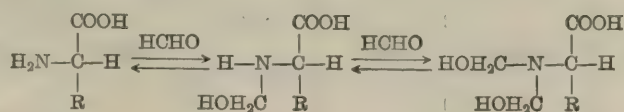
例题 1-46

画出用 KOH 滴定 100 毫升 0.1 M 丙氨酸盐酸盐的 pH 曲线: (a) 无过量甲醛, (b) 有过量甲醛。

解:

(a) 该滴定曲线与典型的二元酸滴定曲线相似,即在 $\text{p}K_a$ 值区有两个缓冲平稳段。从起点滴定到第一终点(等当量点),每摩尔氨基酸消耗 1 摩尔 OH^- ;而到达中途点($\text{p}K_{a1}$)时,每摩尔氨基酸消耗 0.5 摩尔 OH^- 。从第一终点滴定到第二终点(等当量点)时,每摩尔氨基酸又需 1 摩尔 KOH;使 pH 到达第一和第二等当量点之间的中途点(达到 $\text{p}K_{a2}$ 值)时,每摩尔氨基酸盐酸盐消耗 1.5 摩尔 KOH。

(b) 甲醛与氨基反应形成羟甲基衍生物。



此羟甲基衍生物与原来未取代的氨基相比是较强的酸(较弱的碱)。换句话说,该取代氨基酸的 $\text{p}K_{a2}$ 值比原氨基酸的 $\text{p}K_{a2}$ 值低。其滴定曲线绘制于图 1-7 中。注意,甲醛对于该氨基酸被滴定到 $\text{p}K_{a1}$ 、 $\text{p}K_{a2}$ (或 $\text{p}K'_{a2}$) 以及各等当量点时所需 KOH 量无影响。也要注

意, 仅 pK_{a2} 值有变动, 甲醛对 α -COOH 基无影响。

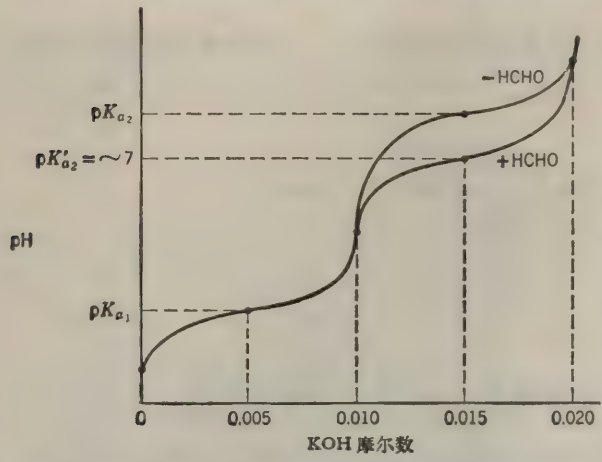


图 1-7 在有、无甲醛时, 0.01 摩尔丙氨酸盐酸盐的滴定曲线。

pI 也可以认为是等电形式氨基酸溶液的 pH 。

氨基酸的 pI 是在滴定曲线上某等当量点处的 pH , 特别是全部 AA^{+1} 转变成 AA^0 时等当量点处的 pH 。通常, 这一点的 pH 是后面一个 pK_a 值和前面一个 pK_a 值的平均值。同样, pH_m 也是一个等当量点处的 pH , 并可以类似地计算。为了确定 pI 和 pH_m , 只要画出其滴定曲线并指出每个关键点处所存在的主要离子形式。或准备一个表格, 说明在关键点处可滴定基团的离子形式。为简明起见, 假定你将从最大质子化了的氨基酸或肽开始。

(a) 甘氨酸。如表 1-3 所示, 在第一等当量点, 甘氨酸以“两性离子”或等电形式存在。在这一点, 甘氨酸所携带的总电荷数也最多。所以,

$$pI = pH_m = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2} = \frac{2.34 + 9.6}{2} = \frac{11.94}{2} = 5.97$$

表 1-3 天冬氨酸

在滴定曲线的不同位置, 主要的离子形式							
可电离基团	开始	pK_{a1}	第一等当量点	pK_{a2}	第二等当量点	pK_{a3}	第三等当量点
α -羧基	COOH	$COOH(\frac{1}{2})$ $COO^-(\frac{1}{2})$	COO^-	COO^-	COO^-	COO^-	COO^-
β -羧基	COOH	COOH	COOH	$COOH(\frac{1}{2})$ $COO^-(\frac{1}{2})$	COO^-	COO^-	COO^-
α -氨基	NH_3^+	NH_3^+	NH_3^+	NH_3^+	NH_3^+	$NH_3^+(\frac{1}{2})$ $NH_2(\frac{1}{2})$	NH_2
净电荷	+1	$+\frac{1}{2}$	0	$-\frac{1}{2}$	-1	$-1\frac{1}{2}$	-2

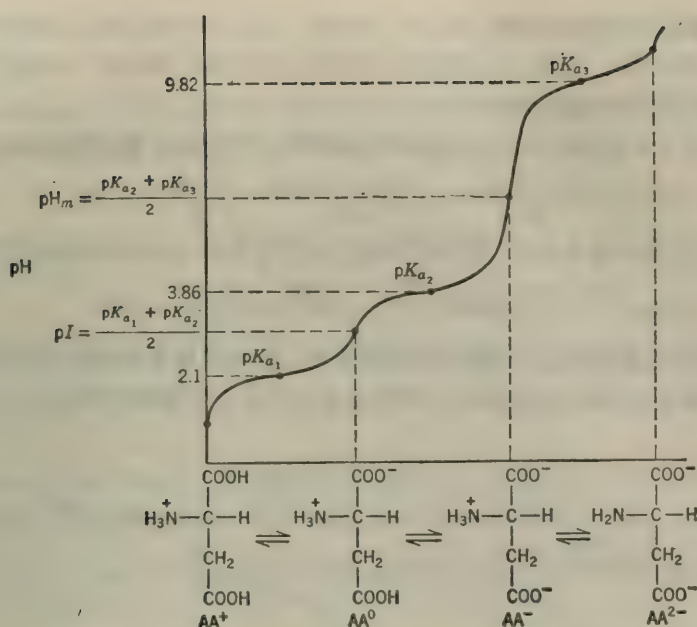


图 1-8 天冬氨酸的滴定曲线。为清楚起见，纵坐标未按比例画出。

(b) 天冬氨酸。从表 1-3 和图 1-8 可以看到，天冬氨酸在第一等当量点不带净电荷。

$$pI = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2} = \frac{2.09 + 3.86}{2} = \frac{5.95}{2} = 2.98$$

我们还可以看到，在第二等当量点，天冬氨酸所携带的总电荷数最多。

$$pH_m = \frac{pK_{a2} + pK_{a3}}{2} = \frac{3.86 + 9.82}{2} = \frac{13.68}{2} = 6.84$$

在制表 1-3 时，我们假定，在第一等当量点 α -羧基完全电离，而 β -羧基完全不电离。当然，这些假定并不完全属实。 α -和 β -羧基的实际电离度可借 Henderson-Hasselbalch 方程算出。如果我们进行了计算，就会发现，仍然以 COOH 形式存在的 α -羧基的比例恰好等于

表 1-4 赖氨酸

在滴定曲线的不同位置，主要的离子形式

可电离基团	开始	pK_{a1}	第一等当量点	pK_{a2}	第二等当量点	pK_{a3}	第三等当量点
α -羧基	COOH	$\text{COOH} \left(\frac{1}{2} \right)$ $\text{COO}^- \left(\frac{1}{2} \right)$	COO^-	COO^-	COO^-	COO^-	COO^-
α -氨基	NH_3^+	NH_3^+	NH_3^+	$\text{NH}_3^+ \left(\frac{1}{2} \right)$ $\text{NH}_2 \left(\frac{1}{2} \right)$	NH_2	NH_2	NH_2
ϵ -氨基	NH_3^+	NH_3^+	NH_3^+	NH_3^+	NH_3^+	$\text{NH}_3^+ \left(\frac{1}{2} \right)$ $\text{NH}_2 \left(\frac{1}{2} \right)$	NH_2
净电荷	+2	$+1 \frac{1}{2}$	+1	$+\frac{1}{2}$	0	$-\frac{1}{2}$	-1

以 COO^- 形式存在的 β -羧基的比例 (在 pH 2.98 处, 高出 α -羧基 $\text{p}K_{a1}$ 的距离, 恰好是低于 β -羧基 $\text{p}K_{a3}$ 的距离)。于是, 为了确定分子的净电荷, 我们只要数一数滴定曲线每个关键点处的主要离子形式的电荷数就可以了。

(c) 赖氨酸。从表 1-4 和图 1-9 我们可以看到, 在第二等当量点, 赖氨酸的净电荷等于零。

$$\text{pI} = \frac{\text{p}K_{a2} + \text{p}K_{a3}}{2} = \frac{8.95 + 10.53}{2} = \frac{19.48}{2} = 9.74$$

我们还看到, 在第一等当量点, 赖氨酸所带总电荷数最多 (全部可电离基团都带电)。

$$\text{pH}_m = \frac{\text{p}K_{a1} + \text{p}K_{a2}}{2} = \frac{2.18 + 8.95}{2} = \frac{11.13}{2} = 5.57$$

我们假定, 在第二等当量点, α -氨基完全不荷电, 而 ϵ -氨基完全电离。这些假定对于计算赖氨酸的净电荷是正确的, 其理由同于前面所叙述过的天冬氨酸的情况。

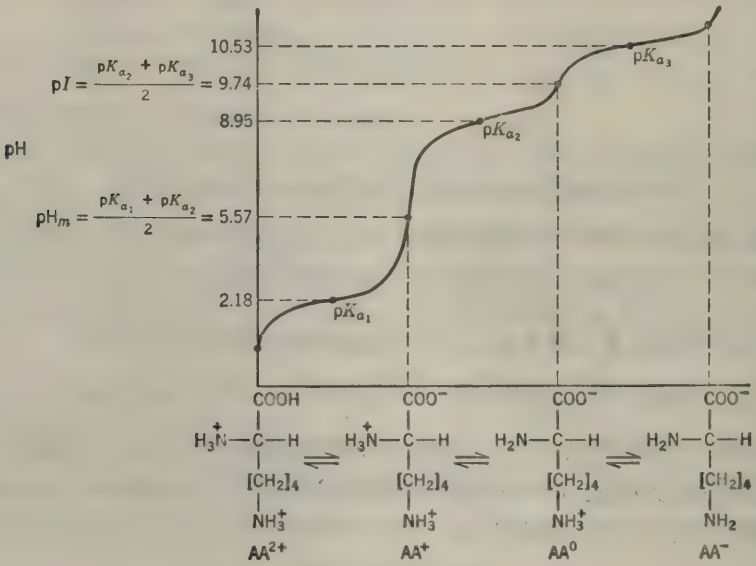


图 1-9 赖氨酸的滴定曲线。为清楚起见, 纵坐标未按比例画出。

例题 1-48

催化赖氨酸脱羧作用的酶仅接受等电形式的赖氨酸做它的底物。在 pH 7.60 的缓冲剂中, $10^{-3} M$ 赖氨酸溶液的等电赖氨酸实际浓度是多少?

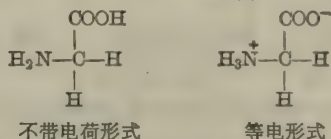
解:

当 pH 为 7.60 时, 赖氨酸的主要离子形式是 AA^+ 和 AA^0 (图 1-9)。此二种离子间的平衡由 K_{a2} 所描述。

$$\begin{aligned} \text{pH} &= \text{p}K_{a2} + \log \frac{[\text{AA}^0]}{[\text{AA}^+]}, & 7.60 &= 8.95 + \log \frac{[\text{AA}^0]}{[\text{AA}^+]} \\ 1.35 &= \log \frac{[\text{AA}^+]}{[\text{AA}^0]}, & \frac{[\text{AA}^+]}{[\text{AA}^0]} &= \frac{22.4}{1} \\ \therefore [\text{AA}^0] &= \frac{1}{23.4} \times 10^{-3} & [\text{AA}^0] &= 4.27 \times 10^{-5} M \end{aligned}$$

例题 1-49

通常假定,下面所示完全不带电荷的中性氨基酸在溶液中并不存在。而是,以甘氨酸为例来说,在 pH 接近 pI 时,其主要离子形式是等电形式的。



假设 $pK_{a1} \approx 2.5$ 和 $pK_{a2} \approx 9.5$, 求: 在 pH 5.5 时, 以“稀有的”不带电荷形式存在的甘氨酸占总甘氨酸的分数。

解:

根据 Henderson-Hasselbalch 方程, 我们得知, 在 pH 5.5 时, $\text{R-COOH}/\text{R-COO}^-$ 比值约为 10^{-3} (该溶液 pH 值比 pK_{a1} 高 3 个 pH 单位)。 $\text{R-NH}_2/\text{R-NH}_3^+$ 比值大约是 10^{-4} (该溶液 pH 值比 pK_{a2} 低 4 个 pH 单位)。 所以, 组合后所得 $\text{H}_2\text{N-R-COOH}/\text{H}_3\text{N}^+-\text{R-COO}^-$ 比值是 $10^{-3} \times 10^{-4} = 10^{-7}$ 。

∴ 以完全不带电形式存在的甘氨酸占总甘氨酸的一千万分之一

关于氨基酸、肽和蛋白质荷电特性的其它一些例题可于第二章找到。

例题 1-50

计算 pH 9.6, 0.05 M 甘氨酸缓冲剂的离子强度。

解:

因为 $\text{pH} = \text{p}K_{a2}$, 所以 $[\text{AA}^0] = [\text{AA}^-]$ 。 现有甘氨酸形式中只有带净电荷的 AA^- 对离子强度起作用。 如果该缓冲剂是用 NaOH 滴定等电甘氨酸 (AA^0) 制成的, 则该溶液含有 0.025 M AA^0 、0.025 M AA^- 和 0.025 M Na^+ 。 1:1 盐的离子强度等于其中任一离子的摩尔浓度。

$$\therefore \frac{I}{2} = 0.025$$

如果该缓冲剂是用 NaOH 滴定 0.05 摩尔甘氨酸盐酸盐 (AA^-) 制成的, 那么, 当 pH 为 9.6 时, 该缓冲剂含有 0.050 M Cl^- 、0.075 M Na^+ 、0.025 M AA^- 和 0.025 M AA^0 。 其中, 头三种离子将对离子强度起作用:

$$\frac{I}{2} = \frac{(0.050) + (0.075) + (0.025)}{2} = 0.075$$

所以, 如果低离子强度是重要的考虑因素, 该缓冲剂最好用第一种方法制备。

例题 1-51

绘制滴定 1 摩尔谷氨酰-丝氨酰-谷氨酰-缬氨酸盐酸盐的 pH 曲线。

解:

关于肽的滴定及缓冲剂的计算完全和前面所介绍的关于多元酸的方法一样。 必须记住, 用以构成肽键的氨基酸羧基已不适于滴定。 完全质子化了的谷氨酰-丝氨酰-谷氨酰-缬氨酸结构如下所示。 假定 $\alpha\text{-COOH}$ 基维持 $pK_a \sim 2.5$, 而两个 $\gamma\text{-COOH}$ 基的 pK_a 均为 ~ 4.0 。

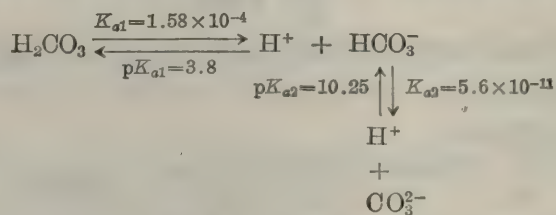
$$\begin{array}{ccccccc}
 & \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{O} & & \text{H} & \text{H} & \text{H} \\
 & | & | & | & || & & | & | & | \\
 (\text{pK}_{a3} \sim 9.5) & \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} - \text{N} - \text{C} - \text{C} - \text{N} - \text{C} - \text{C} - \text{N} - \text{C} - \text{COOH} & (\text{pK}_{a1} \sim 2.5) \\
 & | & || & & & | & || & & | \\
 & \text{Cl}^- & \text{CH}_2 & & \text{CH}_2 & \text{H} & \text{CH}_2 & & \text{H} - \text{C} - \text{CH}_3 \\
 & & | & & | & & | & & | \\
 & & \text{CH}_2 & & \text{OH} & & \text{CH}_2 & & \text{CH}_3 \\
 & & | & & & & | & & \\
 & & \text{COOH} & & & & \text{COOH} & & \\
 & & (\text{pK}_{a2} \sim 4) & & & & (\text{pK}_{a2} \sim 4) & &
 \end{array}$$

Figure 1 is a graph showing the relationship between pH and the molar ratio of OH^- to HCl . The x-axis represents the molar ratio of OH^- to HCl (摩尔数/摩尔), ranging from 0 to 4.0. The y-axis represents pH, ranging from approximately 2.5 to 9.5. The curve is sigmoidal, indicating a titration process. Key points on the curve are marked with dashed lines extending to the axes:

- At a ratio of 0.5, the pH is approximately 2.5.
- At a ratio of 1.0, the pH is approximately 3.25, labeled as pI .
- At a ratio of 2.0, the pH is approximately 4.0.
- At a ratio of 3.0, the pH is approximately 6.75, labeled as pH_M .
- At a ratio of 3.5, the pH is approximately 9.5.
- At a ratio of 4.0, the pH is approximately 9.5.

F. 血液缓冲剂

$\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 系统是两个主要的血液缓冲剂之一。碳酸的电离象一个典型的二元弱酸:


$$\begin{array}{c} \text{CO}_2(\text{气}) \\ \updownarrow k \\ \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightleftharpoons{K_{\text{平}1}} \text{H}_2\text{CO}_3 \xrightleftharpoons{K_{a1}} \text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \\ (\text{已溶解}) \end{array} \quad \begin{array}{c} \text{CO}_3^{2-} \\ + \\ \text{H}^+ \\ \updownarrow K_{a2} \end{array}$$

CO₂(气)和CO₂(已溶解)间的平衡由下式给定:

$$[\text{CO}_2]_{\text{溶解}} = k(P_{\text{CO}_2}) \quad (41)$$

即溶解的CO₂浓度与气相CO₂分压成正比。在37°C和离子强度为0.15,而P_{CO₂}以mm Hg表示时, $k = 3.01 \times 10^{-5}$ 。对于反应: 溶解的CO₂ + H₂O \rightleftharpoons H₂CO₃, 其平衡常数约为 5×10^{-8} 。

$$K_{\text{a1}} = \frac{[\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{CO}_2]_{\text{溶解}}} = 5 \times 10^{-8}$$

这样,溶解的CO₂和H⁺ + HCO₃⁻之间的总平衡常数为

$$K'_a = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]} = K_{\text{a1}} \times K_{\text{a1}} = (5 \times 10^{-8})(1.58 \times 10^{-4}) = 7.9 \times 10^{-7}$$

$$\text{且} \quad \text{p}K'_a = 6.1$$

这个关系也可以写成

$$K'_a = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{(3.01 \times 10^{-5})P_{\text{CO}_2}} = 7.9 \times 10^{-7}$$

在任意pH时:

$$\text{pH} = 6.1 + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]} \quad \text{和} \quad \text{pH} = 6.1 + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{(3.01 \times 10^{-5})P_{\text{CO}_2}}$$

在实际应用上,碳酸氢盐缓冲剂可看作由HCO₃⁻(共轭碱)和溶解的CO₂(共轭酸)组成的。

血液pH被保持在7.4左右。如果CO₂的pK'_a是6.1的话,HCO₃⁻/CO₂如何能使血液缓冲在pH7.4呢?迄今我们所学到的一切表明,缓冲剂仅仅在它的pK'_a附近才是有效的。这里的关键是,在体内,HCO₃⁻/CO₂缓冲剂是个敞开系统,在该系统中,溶解的CO₂浓度被保持恒定。因反应: H⁺ + HCO₃⁻ \rightarrow H₂O + CO₂所产生的任何多余CO₂均由肺部排出体外。相反,普通实验室常用的缓冲剂是一封闭系统,当H⁺与共轭碱反应时,共轭酸的浓度增加。下面具体说明敞开系统的有效性。

例题 1-52

血浆中含 $2.52 \times 10^{-2} M$ 的总碳酸库(主要是HCO₃⁻ + CO₂)。(a)在pH7.4时,HCO₃⁻/CO₂比值和所存在的每种缓冲组分的浓度是多少?(b)如果在增加的[CO₂]不能释放出去的条件下,加入 $10^{-2} M$ H⁺,pH将是多少?(c)如果加入 $10^{-2} M$ H⁺而且将多余CO₂排出时(从而保持其原始[CO₂]),pH将是多少?

解:

$$(a) \quad \text{pH} = \text{p}K'_a + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]}, \quad 7.4 = 6.1 + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]}$$

$$1.3 = \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]} \quad \therefore \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]} = \frac{20}{1}$$

$$[\text{HCO}_3^-] = \frac{20}{21} \times 2.52 \times 10^{-2} = 2.40 \times 10^{-2} M$$

$$[\text{CO}_2] = 1.2 \times 10^{-3} M$$

(b) 如果加入了 $0.01 M$ H⁺:

$$[\text{HCO}_3^-]_{\text{新}} = 0.024 - 0.010 = 0.014 M$$

$$[\text{CO}_2]_{\text{新}} = 0.0012 + 0.010 = 0.0112 M$$

$$\text{pH} = 6.1 + \log \frac{0.014}{0.0112} = 6.1 + \log 1.25 = 6.1 + 0.097$$

$$\text{pH} = 6.2$$

显然, 在封闭系统中, pH 为 7.4 时, $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 混合物的缓冲容量非常小。

(o) 在敞开系统中:

$$\begin{array}{c} \boxed{0.024 M \text{HCO}_3^- + 0.01 M \text{H}^+ + 0.0012 M \text{CO}_2} \\ \downarrow \\ \boxed{0.014 M \text{HCO}_3^- + 0.0112 M \text{CO}_2} \\ \downarrow \rightarrow 0.01 M \text{CO}_2 \text{ 被排出} \\ 0.014 M \text{HCO}_3^- + 0.0012 M \text{CO}_2 \\ \text{pH} = 6.1 + \log \frac{0.014}{0.0012} = 6.1 + \log 11.667 = 6.1 + 1.07 \\ \text{pH} = 7.17 \end{array}$$

在敞开系统中, pH 仅降低了 0.24 pH 单位。乍一看, 似乎在敞开系统中, HCO_3^- 的储备量将会迅速地被耗尽; 然而在体内, 正如下节所述, 通过氧化代谢途径, HCO_3^- 不断地得到补充。

例题 1-53

某动脉血样的 pH 是 7.42。酸化 10 毫升该血液, 产生 5.91 毫升 CO_2 (已做过标准温度和压力方面的校正)。计算: (a) 血液中溶解的 CO_2 总浓度 $[\text{CO}_2 + \text{HCO}_3^-]$, (b) 溶解的 CO_2 和 HCO_3^- 浓度, 和 (c) 溶解的 CO_2 以 mm Hg 表示的分压。

解:

(a) 首先计算在标准温度和压力(S. T. P.)下由 5.91 毫升 CO_2 所代表的摩尔数。1 摩尔“理想”气体在 S. T. P. 下所占的体积为 22.4 升。 CO_2 的实验值是 22.26 升。

$$\therefore \frac{5.91 \times 10^{-3} \text{ 升}}{22.26 \text{ 升/摩尔}} = 0.265 \times 10^{-3} \text{ 摩尔}$$

这一 CO_2 量来自 10 毫升血液。

$$\therefore \text{“总体 } \text{CO}_2 \text{” 浓度} = \frac{26.5 \times 10^{-5} \text{ 摩尔}}{10 \times 10^{-3} \text{ 升}} = 2.65 \times 10^{-2} M$$

$$\begin{aligned} \text{(b)} \quad \text{pH} &= \text{p}K_{a1} + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]} \\ 7.42 &= 6.1 + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]}, \quad 1.32 = \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]} \\ \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]} &= \text{antilog } 1.32 = \frac{20.89}{1} \end{aligned}$$

$$[\text{HCO}_3^-] = \frac{20.89}{21.89} \times 2.65 \times 10^{-2} M = 2.53 \times 10^{-2} M$$

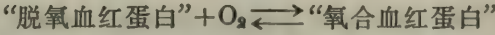
$$[\text{CO}_2] = \frac{1}{21.89} \times 2.65 \times 10^{-2} M = 1.21 \times 10^{-3} M$$

$$\begin{aligned} \text{(c)} \quad [\text{CO}_2]_{\text{气}} &= k P_{\text{CO}_2} \\ P_{\text{CO}_2} &= \frac{[\text{CO}_2]}{k} = \frac{1.21 \times 10^{-3}}{3.01 \times 10^{-5}} = 40.22 \text{ mm Hg} \end{aligned}$$

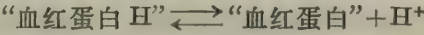
血红蛋白

血红蛋白除了作为载氧体的熟知功能外，它还扮演着血液缓冲剂的重要角色。为了理解氧的吸收和释放之间的相互关系以及血红蛋白的缓冲作用，我们必须考虑几个同时进行的平衡反应间的相互作用。下面提出一个关于这些平衡的一个大为简化的模型¹⁾。

任何时刻，血红蛋白都以脱氧形式和氧合形式的混合物而存在的。每种形式的比例决定于 O_2 浓度(分压)。



血红蛋白含有许多可电离基团，尤其是其中的组氨酸残基，它的 pK_a 近于中性。所以，在任何时刻，血红蛋白也是作为已质子化形式和未质子化形式的混合物而存在的。每种形式的比例取决于血液的 pH



为了联合这两个同时进行的平衡反应，我们必须承认，“脱氧血红蛋白”所代表的是已质子化脱氧血红蛋白(共轲酸)加未质子化脱氧血红蛋白(共轲碱)的混合物。同样，“氧合血红蛋白”所代表的也是氧合血红蛋白 H(共轲酸)和氧合血红蛋白(共轲碱)的混合物。换一种方式说：血红蛋白的共轲酸以氧合和脱氧两种形式存在；血红蛋白的共轲碱也是这样。因此，在任何时刻，实际上存在着四种形式的血红蛋白，每种血红蛋白的比例取决于 O_2 浓度和 pH 。被联合起来的平衡反应如图 1-11 所示。

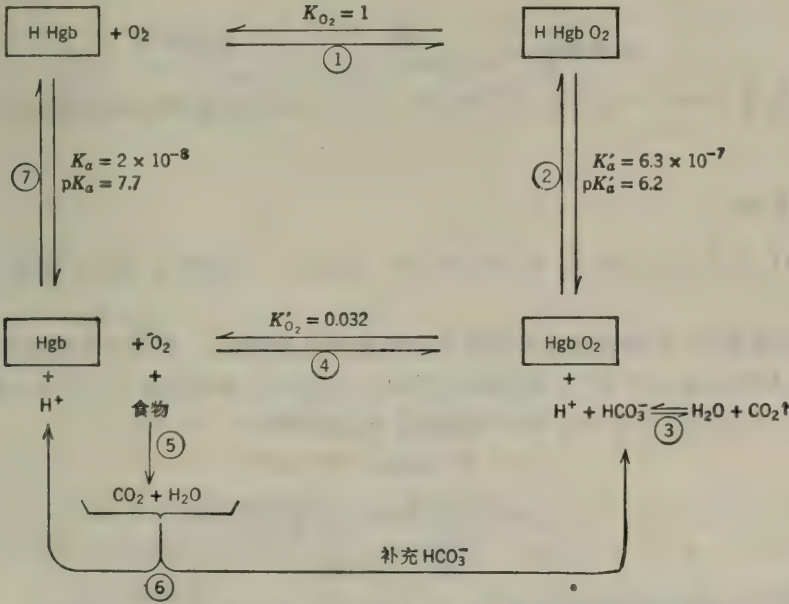
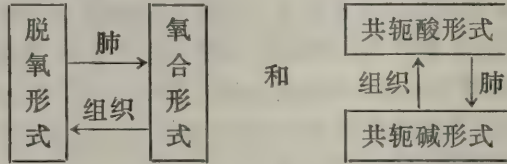


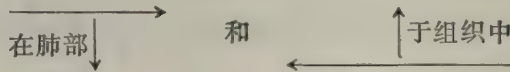
图 1-11 血红蛋白氧/ H^+ 平衡的简化模式图。任意取 K_{O_2} 为单位，所有常数均为解离常数。 pK_a 取 7.7，但从 7.71 到 8.18 等数值均有报道。 pK'_a 取 6.2，但从 6.17 到 6.68 等数值均有报道。

1) 这种简化模型只考虑单个 O_2 分子与血红蛋白单体的结合。这样，氧与 $HHgb$ 或 Hgb 的结合作用就可以用单纯的氧解离常数来描述。此模型的“饱和百分率对 $[O_2]$ ”曲线将为双曲线。血红蛋白实际为一四聚体，在与四个氧分子结合时，表现出一种“协同”(cooperative)作用。 O_2 合曲线呈 S 形(第四章)。本讨论所用的简图不甚正确，但它概括了 O_2 、 H^+ 和 CO_2 之间相互作用的基本特征。

红血球中的血红蛋白到达肺部时，主要是作为脱氧形式的 $\text{HHgb} + \text{Hgb}$ 混合物而存在的。每种形式的比例由 pH 和脱氧血红蛋白的 $\text{p}K_a$ 所支配。由于 pH 约为 7.4，而 $\text{p}K_a$ 约为 7.7，全部脱氧血红蛋白中约有 2/3 以共轭酸的形式存在。在肺部，血红蛋白挑选了氧，横向平衡移往右方（反应①）， HHgbO_2 的酸性比 HHgb 强（氧合后，分子构象的改变，使血红素附近组氨酸基的 $\text{p}K_a$ 约降到 6.2）。结果，纵向平衡往下移动（反应②）并放出 H^+ 。增加的 $[\text{H}^+]$ 将 $\text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ 平衡向右推（反应③）。其结果是消除了 H^+ 并释放 CO_2 于大气中。氧合血红蛋白（在 pH 7.4 时，主要是作为共轭碱的 HgbO_2 ）被输送到组织中，在那里，低氧分压引起横向平衡往左移动，并放出氧（反应④）。 Hgb 比 HgbO_2 的碱性强（照样， HHgbO_2 比 HHgb 酸性强）。这样，氧被放出之后，纵向平衡往上移动。结果， H^+ 离子（由于食物的氧化而产生的——反应⑥）被 Hgb 接受（反应⑦）。另一种不同的（但相等）说法是：在组织中，较高的 $[\text{H}^+]$ 将纵向平衡往上推。血红蛋白的共轭酸比其共轭碱对氧的亲合力小（氧的解离常数大），故放出 O_2 （即横向平衡往左移动）。当然， H^+ 和 O_2 的变动是同时发生的。各种反应的变化顺序可总结如下。



或总平衡的变动如下：



总的结果是，食物氧化产生 CO_2 、 H^+ 和 HCO_3^- ，但三者的浓度（因而组织和血液的 pH ）基本保持恒定。

例题 1-54

参阅图 1-11，若 $K_a = 2 \times 10^{-8}$ ， $K'_a = 6.3 \times 10^{-7}$ 和 $K_{O_2} = 1$ ，为什么 K'_{O_2} 一定等于 0.032？

解：不管采取哪条途径，任何两点之间的总平衡常数都是相同的。于是，下列两个反应顺序的 $K_{\text{总}}$ 相等： $\text{HHgbO}_2 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HgbO}_2 \rightleftharpoons \text{O}_2 + \text{Hgb}$ 和 $\text{HHgbO}_2 \rightleftharpoons \text{O}_2 + \text{HHgb} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{Hgb}$ 。反应顺序的总 $K_{\text{总}}$ 为每一步反应 $K_{\text{总}}$ 的乘积。

$$\begin{aligned} \therefore K_{O_2} \times K_a &= K'_a \times K'_{O_2} \\ K'_{O_2} &= \frac{K_{O_2} \times K_a}{K'_a} = \frac{(1)(2 \times 10^{-8})}{(6.3 \times 10^{-7})} \\ K'_{O_2} &= 0.032 \end{aligned}$$

因此， HgbO_2 的氧解离常数比 HHgbO_2 的小（ O_2 结合常数较大）。

例题 1-55

pH 为 7.4 时，血红蛋白接受多少摩尔 H^+ 才能放出 1 摩尔 O_2 ？假定 $\text{p}K_a = 7.7$ 和 $\text{p}K'_a = 6.2$ 。

解：利用 Henderson-Hasselbalch 方程可以算出， pH 为 7.4 时， $15.85/16.85 = 0.941$ 的总体氧

合血红蛋白属于 HgbO_2 形式, 并且 $1/16.84 = 0.059$ 属于 HHgbO_2 形式. 同样可以算出, 在 $\text{pH} 7.4$ 时, Hgb 形式的脱氧血红蛋白占总体脱氧血红蛋白的三分之一等于 0.333 , 而 HHgb 占三分之二等于 0.667 . 这样, 当放出 1 摩尔 O_2 之后, 共轭碱与共轭酸之比必定减小以便维持平衡. 即, 对于氧合血红蛋白而言, 其共轭碱与共轭酸的平衡比 ($15.85:1$) 要比脱氧血红蛋白的相应平衡比 ($0.5:1$) 高得多. 所以, 当氧合血红蛋白转变成脱氧血红蛋白时, 其共轭碱的量必定减少(通过选取 H^+ 变成共轭酸). 特别是, 释放 1 摩尔 O_2 迫使它吸收 $(0.667 - 0.059)$ 或 $(0.941 - 0.333) = 0.608$ 摩尔 H^+ . 在生理条件下, 每释放 1 摩尔 O_2 便形成比 0.6 摩尔稍多一点的 H^+ (来自进入血液的 CO_2). 这个额外 H^+ 部分地被非碳酸盐血液缓冲剂吸收(磷酸盐和血浆蛋白质). 结果, 在正常的处于休息状态的个体中, 静脉血的 pH 实际上是 7.38 , 而动脉血的 pH 为 7.41 .

例题 1-56

血红蛋白的氧合曲线如图 1-12 所示. 有 CO_2 存在时, 为达到任何给定氧饱和度所需要的氧分压提高了. 解释这个众所周知的“波尔效应”(Bohr effect).

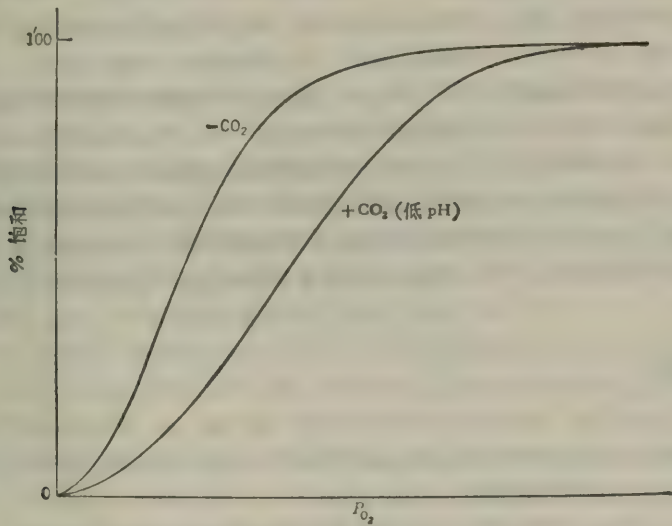


图 1-12 在有 CO_2 存在和无 CO_2 存在时的氧合曲线。

解:
如图 1-11 所示, HHgbO_2 的氧解离常数比 HgbO_2 的大, 即 HHgb 对氧的亲合力比 Hgb 低. 事实上, CO_2 移动了血红蛋白共轭酸和共轭碱两种形式之间的平衡. 在体内, CO_2 迅速弥散到红血球中, 并与水反应生成 $\text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ (实际上, 红血球里含有一种酶, 叫做碳酸酐酶, 它加速了反应: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$). 降低了的 pH 将图 1-11* 的纵向平衡往上移动. 于是, 迫使血红蛋白变成对氧的亲合力较小的形式并放出氧. 换句话说, 由于 CO_2 引起 pH 降低, 故在任何给定氧分压下, 有 CO_2 存在时, 氧结合于血红蛋白的数量较少. 结果是, 为达到任何给定的饱和百分率, 需要较高的 P_{O_2} .

* 原文误写成图 1-10——译者注。

一般参考文献

- Christensen, H. N., *Body Fluids and the Acid-Base Balance*. W. B. Saunders (1965).
Gomori, G., "Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies" in *Methods in Enzymology*. S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds., Vol. 1, p. 138, Academic Press (1955).
Good, N. E. and S. Izawa, "Hydrogen Ion Buffers" in *Methods in Enzymology*. A. San Pietro, ed., Vol. 24, p. 53, Academic Press (1972).
Masoro, E. J. and P. D. Siegel, *Acid-Base Regulation: Its Physiology and Pathophysiology*. W. B. Saunders (1971).

练 习 题

有关 K_a 和 pK_a 值参看附录 IV 和附录 VII. 习题答案见第 303—305 页.

溶液的浓度

1. 某溶液总体积为 190 毫升, 其中含 15 克 CaCl_2 . 将此溶液浓度表示成: (a) 克/升, (b) % (重量/体积), (c) 毫克%, (d) M , 和 (e) 等渗摩尔浓度. (f) 该溶液的离子强度是多少?
2. 某溶液由 8.4 克固体硫酸铵 ($MW = 132.14$, 比容 = 0.565 毫升/克) 溶于 35 毫升水 (即 35 克) 中制成. (a) 该溶液的最终体积是多少? 将硫酸铵的浓度表示为: (b) % (重量/重量), (c) % (重量/体积), (d) m , (e) M , (f) 等渗摩尔浓度, 和 (g) 摩尔分数硫酸铵, (h) 该溶液的离子强度是多少?
3. 在 0°C , 从 150 毫升 40% 饱和度的硫酸铵溶液着手计算: (a) 使该溶液变成 60% 饱和度所需加入的固体硫酸铵量, 和 (b) 使达到 60% 饱和度所需加入饱和硫酸铵体积. 硫酸铵的比容是 0.565 毫升/克.
4. 纯乙醇的摩尔浓度是多少? 即一升纯乙醇中有多少摩尔乙醇? 乙醇的密度是 0.789 克/毫升. 乙醇的 MW 为 46.07.

强酸和强碱——pH

5. 计算下列溶液的 pH, pOH 和每升含 H^+ 和 OH^- 离子数: (a) $0.01 M \text{HCl}$, (b) $10^{-4} M \text{HNO}_3$, (c) $0.0025 M \text{H}_2\text{SO}_4$, (d) $3.7 \times 10^{-5} M \text{KOH}$, (e) $5 \times 10^{-8} M \text{HCl}$, (f) $2.9 \times 10^{-3} M \text{NaOH}$, (g) $1 M \text{HCl}$, (h) $10 M \text{HNO}_3$, 和 (i) $3 \times 10^{-5} N \text{H}_2\text{SO}_4$.
6. 计算溶液的 H^+ 离子浓度 (M), OH^- 离子浓度和每升溶液含有的 H^+ 和 OH^- 离子数, 若该溶液 pH 为: (a) 2.73, (b) 5.29, (c) 6.78, (d) 8.65, (e) 9.52, (f) 11.41, 和 (g) 0.
7. 将 100 毫升 $0.2 M \text{NaOH}$ 加到 150 毫升 $0.4 M \text{H}_2\text{SO}_4$ 中, 计算所得溶液的: (a) $[\text{H}^+]$, (b) $[\text{OH}^-]$, (c) pH, 和 (d) pOH .
8. 将 0.2 克固体 KOH 加到 1.5 升 $0.002 M \text{HCl}$ 中, 计算所得溶液的 pH 和 pOH .
9. $0.10 M \text{HCl}$ 溶液的 pH 值为 1.15. 计算该溶液的 (a) α_{H^+} , 和 (b) γ_{H^+} .
10. 在 $0.1 M \text{KOH}$ 溶液中, 氢氧根离子的活度系数 (γ_{OH^-}) 为 0.72. 计算该溶液的 pH 和 pOH .
11. 浓硫酸系重量百分比为 96% 的硫酸, 其密度为 1.84 克/毫升. 计算配成下列溶液所需浓硫酸体积: (a) 750 毫升 $1 N \text{H}_2\text{SO}_4$, (b) 600 毫升 $1 M \text{H}_2\text{SO}_4$, (c) 1000 克重量百分比为 12% 的稀硫酸, (d) 每升含 6.5 当量的 H_2SO_4 溶液, 和 (e) pH 3.8 的稀 H_2SO_4 溶液.
12. 浓 HCl 系重量百分比为 37.5% 的 HCl , 其密度为 1.19. (a) 计算该浓酸的摩尔浓度, (b) 说明 500 毫升 $0.2 M \text{HCl}$ 的配制方法, (c) 说明 350 毫升 $0.5 N \text{HCl}$ 的配制方法, (d) 说明重量百分比为 25% 的 HCl 溶液的配制方法, (e) 说明 pH 4.7 的稀 HCl 溶液的配制方法.

13. 计算配制下列溶液所需固体 NaOH 重量: (a) 5 升 2 M 溶液, (b) 2 升 pH 11.5 溶液, (c) 500 毫升 62% W/W 溶液. 62% NaOH 溶液的密度为 1.15 克/毫升.
14. 将 540 毫升 0.18 N NaOH 中 OH^- 离子恰好中和一半需多少毫升 0.12 M H_2SO_4 ?
15. 恰好中和 2 升 pH 2.0 的 HCl 溶液需多少克固体 Na_2CO_3 ?
16. 恰好中和 180 克纯 H_2SO_4 需多少毫升 0.15 M KOH?

弱酸和弱碱——缓冲溶剂

除非另有说明,解下列习题时,假定所有物质的 $\gamma=1$.

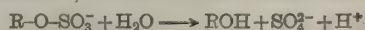
17. 弱酸 HA 在 0.22 M 溶液中解离 2.4%. 计算: (a) K_a , (b) 该溶液的 pH, (c) 中和 550 毫升该弱酸溶液所需 0.1 N KOH 量, (d) 550 毫升该弱酸溶液中的 H^+ 离子数.
18. 某 0.27 M 弱酸 HA 溶液, 其 pH 为 4.3. (a) 该溶液中 H^+ 离子浓度是多少? (b) 该酸的电离度是多少? (c) K_a 是多少?
19. 某弱酸 HA 的 K_a 为 3×10^{-4} . 计算: (a) 此溶液的 OH^- 离子浓度, 和 (b) 在 0.15 M 溶液中该酸的解离度.
20. 某弱酸 HA 在何种浓度下(用其 K_a 值表示)解离 25%?
21. (a) 计算 0.05 M 乙醇胺溶液的 pH, $K_b=2.8 \times 10^{-5}$; (b) 此胺的电离度是多少?
22. 计算 K_a 为下列数值时弱酸的 $\text{p}K_a$ 和 $\text{p}K_b$: (a) 6.23×10^{-4} , (b) 2.9×10^{-5} , (c) 3.4×10^{-5} , 和 (d) 7.2×10^{-6} .
23. 计算 K_b 为下列数值时弱碱的 $\text{p}K_b$ 和 $\text{p}K_a$: (a) 2.1×10^{-5} , (b) 3.1×10^{-6} , (c) 7.8×10^{-5} , 和 (d) 9.2×10^{-4} .
24. 计算 $\text{p}K_a$ 为 9.5, 某 0.2 M 胺溶液的 pH.
25. 0.20 M 下列溶液的 pH 是多少? (a) H_3PO_4 , (b) KH_2PO_4 , (c) K_2HPO_4 , (d) K_3PO_4 , (e) 醋酸钾, (f) NH_4Br , (g) 苯酚钠, (h) 柠檬酸三钠, (i) 柠檬酸二钠, 和 (j) 乙醇胺盐酸盐.
26. 完全滴定 270 毫升 0.4 M 丙酸需 0.1 M KOH 多少毫升?
27. 完全滴定 650 毫升 0.05 M 柠檬酸需 0.2 M KOH 多少毫升?
28. 100 毫升 0.2 M KOH 与 150 毫升 0.1 M HOAc 混合所得溶液中氢离子浓度和 pH 是多少?
29. 200 毫升 0.4 M NH_3 水溶液与 300 毫升 0.2 M HCl 混合后所得溶液中氢离子浓度和 pH 是多少? ($K_b=1.8 \times 10^{-5}$)
30. 250 毫升 0.1 M 柠檬酸与 300 毫升 0.1 M KOH 混合后所得溶液中氢离子浓度和 pH 是多少?
31. 400 毫升 0.2 M NaOH 和 150 毫升 0.1 M H_3PO_4 混合后所得溶液中氢离子浓度和 pH 是多少?
32. 在 pH 为 9.6, 0.15 M “氨”缓冲剂中, NH_3 和 NH_4Cl 浓度是多少? ($K_b=1.8 \times 10^{-5}$)
33. (a) 含 0.01 M HPO_4^{2-} 和 0.01 M PO_4^{3-} (设 $\gamma=1$) 溶液的 pH 值是多少? (b) 利用列于附录 V 的活度系数计算其真实 pH, (c) 在总离子强度为 0.1 时, $\text{p}K'_a$ 是多少?(参考附录 VI)
34. 含 0.3 M 三(羟甲基)氨基甲烷(自由碱)和 0.2 M Tris 盐酸盐溶液的 pH 是多少? ($\text{p}K_a=8.1$)
35. 含 0.2 克/升 Na_2CO_3 和 0.2 克/升 NaHCO_3 溶液的 pH 是多少? ($\text{p}K_{a2}=10.25$)
36. 5.35 克 NH_4Cl 溶液溶于 1 升 0.2 M NH_3 中所得溶液的 pH 是多少? (NH_3 的 K_b 是 1.8×10^{-5})
37. 说明从 1 M 甲酸和固体甲酸钠 (HCOONa) 着手配制 pH 4.5 的 2 升 0.25 M 甲酸盐缓冲剂的方法. HCOOH 的 $\text{p}K_a$ 为 3.75.
38. 说明从下列物质着手配制 40 升 pH 6.9, 0.02 M 磷酸缓冲剂的方法: (a) 2 M H_3PO_4 溶液和 1 M KOH 溶液, (b) 0.8 M H_3PO_4 溶液和固体 NaOH, (c) 商品浓 H_3PO_4 溶液和 1 M KOH, (d) 1 M KH_2PO_4 溶液和 Na_2HPO_4 溶液, (e) 固体 KH_2PO_4 和 K_2HPO_4 , (f) 固体 K_2HPO_4 和 1.5 M HCl, (g) 1.2 M K_2HPO_4 和 2 M H_2SO_4 , (h) 固体 KH_2PO_4 和 2 M KOH, (i) 1.5 M KH_2PO_4 和 1 M NaOH, 和 (j) 固体 Na_3PO_4 和 1 M HCl.

39. 配制 5 升 pH 5.0, 0.2 M 醋酸盐缓冲剂需多少体积的冰醋酸(密度 1.06 克/毫升)和多少重量的固体醋酸钾?

40. 在为 pH 7.2, 0.03 M 磷酸盐所缓冲的溶液中进行某酶促反应, 其结果形成 0.004 摩尔/升的酸。(a) 反应终了时 pH 是多少?(b) 如果不存在缓冲剂, 其 pH 将会是多少?(c) 写出说明磷酸盐缓冲剂如何抵抗较大 pH 变化的化学反应式。

41. 某酶促反应在含 0.2 M Tris 缓冲剂的溶液中进行。开始时, 该反应混合物的 pH 为 7.8。反应结果, 消耗了 0.033 摩尔/升 H^+ 。(a) 反应开始时 Tris⁰(自由碱)与 $Tris^+Cl^-$ 的比值是多少?(b) 反应终了时, $Tris^0/Tris^+$ 比值是多少?(c) 反应混合物的最终 pH 是多少?(d) 若不存在缓冲剂, 最终 pH 会是多少?(e) 写出化学反应式, 说明在反应过程中, 该 Tris 缓冲剂怎样维持近于恒定的 pH。Tris 的 pK_a 为 8.1。

42. 硫酸酯在水解时产生 H^+ 离子:



上述反应在 1.0 毫升 pH 8.10, 0.02 M Tris 缓冲剂中进行。该溶液含 0.01 M $R-O-SO_3^-$ 和催化此反应进行的酶, 谓之硫酸酯酶。10 分钟后, 反应混合物的 pH 降到 7.97。在此 10 分钟的保温过程中, 有多少微摩尔 $R-O-SO_3^-$ 水解了?

43. 计算 pH 6.8, 0.01 M 磷酸盐缓冲剂的酸向和碱向 (a) 瞬时缓冲容量, 和 (b) 实际缓冲容量。

44. 苹果酸的 pK_a 值为 3.40 和 5.05。(a) 0.05 M 苹果酸一钠溶液的 pH 是多少?(b) 当苹果酸用 KOH 滴定时第一等当量点的 pH 是多少?(c) 在 pH 4.70, 0.05 M 溶液中所有形式的苹果酸盐比例和浓度是多少?

氨基酸和肽

45. 计算 1 m M 下列溶液的 pH: (a) 丙氨酸盐酸盐, (b) 等电丙氨酸, 和 (c) 丙氨酸钠盐。

46. 计算完全滴定下列溶液所需 0.1 M KOH 溶液的体积: (a) 450 毫升 0.25 M 丙氨酸盐酸盐, (b) 200 毫升 0.10 M 等电丝氨酸, (c) 400 毫升 0.15 M 谷氨酸一钠, 和 (d) 400 毫升 0.15 M 等电谷氨酸。

47. 计算完全滴定下列溶液所需 0.2 M HCl 溶液的体积: (a) 200 毫升 0.25 M 等电亮氨酸, (b) 375 毫升 0.25 M 等电谷氨酸, (c) 490 毫升 0.25 M 等电赖氨酸, 和 (d) 125 毫升 0.25 M 赖氨酸钠。

48. 将 20 毫升 0.20 M KOH 加到 480 毫升 0.02 M 等电甘氨酸中, 计算所得溶液的 pH。

49. pH 7.5 时 0.15 M 下列溶液中的主要离子形式是什么? (a) 亮氨酸, (b) 天冬氨酸, 和 (c) 赖氨酸。

50. 说明用含一个结晶水的固体组氨酸盐酸盐 ($MW=209.6$) 和 1 M KOH 配制 1 升 pH 6.5, 0.2 M 组氨酸盐缓冲剂的方法。组氨酸的 $pK_{a2}=6.0$ 。

血液缓冲剂

51. 与 CO_2 分压为 40 毫米汞柱的大气相平衡的溶于液体中的 CO_2 浓度是多少?

52. 在 pH 7.4 的血浆中, $CO_2/HCO_3^-/CO_3^{2-}$ 的比值是多少? ($pK_{a1}=6.1$, $pK_{a2}=10.25$)

53. pH 为 7.4 时, 血浆含 $2.4 \times 10^{-2} M HCO_3^-$ 和 $1.2 \times 10^{-3} M CO_2$ 。计算加入 $3.2 \times 10^{-3} M H^+$ 后的 pH, 假定溶解的 CO_2 浓度通过释放多余的 CO_2 维持在 $1.2 \times 10^{-3} M$ 的恒定值。

54. 考虑图 1-11 所示血红蛋白反应示意图。如果 $K_a=6.6 \times 10^{-9}$, $K'_a=2.4 \times 10^{-7}$, 和 $K_o=1$, 问 K'_o 必须是多少?

55. 水生哺乳动物 HHgbO₂ 和 HHgb 的 pK_a 分别是 6.62 和 8.18。计算 pH 7.4 时每放出 1 摩尔 O₂ 血红蛋白所吸收的 H^+ 摩尔数。

(静天玉译 董振芳、吴经才校)

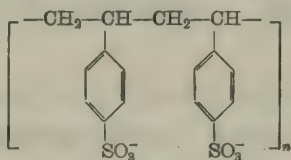
第二章 生物分子的化学

A. 氨基酸、肽和蛋白质

下面两节说明氨基酸和肽的酸、碱特性如何有利于用来设计分离步骤或推测分离图谱。

离子交换层析

离子交换层析法广泛地应用于分离和分析氨基酸混合物。为此目的，最常用的离子交换树脂是 Dowex-50(聚苯乙烯)型的磺酸阳离子交换树脂。该树脂的结构是



将氨基酸混合物加到 Dowex-50 树脂柱中，然后用给定 pH 和离子强度的缓冲液透过柱子而下渗地进行洗脱。氨基酸上的正电荷被静电力吸引到树脂上，另外还有氨基酸的疏水部分与非极性苯环相互配合。在任何 pH 下，任一氨基酸总有一定部分是以荷正电的状态而存在的。具有较高 $[AA^+]/[AA^0]$ 比率的氨基酸在树脂中移动的速度要比具有同样非极性特征而 $[AA^+]/[AA^0]$ 比率低的氨基酸慢些。换言之， $[AA^+]/[AA^0]$ 比率低的氨基酸要在比率高的氨基酸之前洗脱下来(如果这些氨基酸对树脂具有相等的非极性吸引作用)。

快速估量在氨基酸上有效电荷的做法是比较氨基酸的 pI 值和所用缓冲液的 pH 值：令

$$\Delta p = pI - pH$$

若 Δp 为正值，则氨基酸带净正电荷。具有较大 Δp 值的氨基酸要比疏水性相同、但具有较低 Δp 值的氨基酸更牢固地附着在阳离子交换树脂上。若 Δp 为负值，则氨基酸带净负电荷，从而对树脂只有很小的吸引作用。

例题 2-1

将含有天冬氨酸($pI=2.98$)，甘氨酸($pI=5.97$)，苏氨酸($pI=6.53$)，亮氨酸($pI=5.98$)和赖氨酸($pI=9.74$)的 pH 3.0 柠檬酸缓冲液，加到预先用同样缓冲液平衡过的 Dowex-50 阳离子交换柱中。随后用该缓冲液洗脱此柱，并分部地收集洗脱液。这五种氨基酸将按什么次序从柱上洗脱下来？

解：

天冬氨酸有两个局部电离的(带负电荷的)羧基(而且其 Δp 最低)，故首先洗脱下来。另外的三个中性氨基酸中，苏氨酸的 $[AA^+]/[AA^0]$ 比率最大(即 Δp 值最高)，但由于本身的 OH 基使其高度极化，因而，苏氨酸在甘氨酸和亮氨酸之前洗脱下来。甘氨酸和亮氨酸的 Δp 值近似，但亮氨酸的非极化比甘氨酸更显著，因此，甘氨酸第三个洗脱下来，随后是亮氨酸。

赖氨酸由于有另外的氨基 (pI=9.74, Δp=6.74) 其有效正电荷就强烈。因此赖氨酸最后洗脱, 或洗脱不下来; 除非增加洗脱缓冲液的 pH 和(或)离子强度。

电泳

分离带电的化合物, 如氨基酸时, 可利用它们在电场中不同的迁移率。化合物在缓冲的固体支持物上的电泳迁移率大致取决于电荷/质量的比率, 可用数学公式表示如下:

$$\text{迁移率} = \frac{-k\Delta p}{MW} = \frac{k(pH - pI)}{MW} \tag{1}$$

式中, *k* 为常数, 与电压、电泳介质等有关。根据上述公式规定, 迁移率为正值时, 表示运动趋向正极; 为负值时, 表示运动趋向负极。上述公式并不是严格的。出现了反常现象是因为不同离子的水合作用程度不同和各种离子对支持物的结合差别等等。

在任何给定的 pH 值下, 一定介质上的电泳迁移率常以厘米² 伏特⁻¹ 秒⁻¹ 来表示, 如:

$$\text{迁移率} = \frac{\text{单位时间位移}}{\text{电场强度}} = \frac{\text{厘米/秒}}{\text{伏特/厘米}} = \text{厘米}^2 \times \text{伏特}^{-1} \times \text{秒}^{-1}$$

例题 2-2

在 pH 4.70 时, 甘氨酸、亮氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和赖氨酸的相对电泳迁移率为多少?

解:

应用近似的方程式, 我们能推测到赖氨酸向负极移动最快, 其次是甘氨酸, 随后是亮氨酸。天冬氨酸要比谷氨酸向正极移动得快些, 计算结果可总结如下:

氨基酸	分子量 (MW)	pI	迁移率 ∝ $\frac{pH - pI}{MW}$ (在 pH 4.70 时)
赖氨酸	146.2	9.74	-0.0345
甘氨酸	75.1	5.97	-0.0169
亮氨酸	131.2	5.98	-0.0098
谷氨酸	147.1	3.22	+0.0100
天冬氨酸	133.1	2.98	+0.0129

一级结构——排列顺序

确定多肽链(即多肽或蛋白质的一级结构)中氨基酸的排列顺序可用选择性的化学或酶学的解裂蛋白质方法, 和随后对得到的肽碎片的分离、氨基酸分析以及排列顺序的测定来确定。全体氨基酸的排列顺序可由单个碎片相同部位重叠来确定。下面的例题说明这个步骤。

例题 2-3

蛋白质部分地水解后产生若干多肽。提纯其中之一。根据下述资料推测这个多肽的氨基酸排列顺序:

- (a) 完全的酸解产生丙+精+2 丝+赖+苯丙+蛋+色+脯。
- (b) 用二硝基氟苯 (FDNB, Sanger 试剂) 处理, 随后完全酸解所产生的二硝基苯基丙氨酸 (DNP-丙) 和 ε-二硝基苯基赖氨酸 (ε-DNP-赖) 为仅有的 DNP 衍生物。

(c) 羧肽酶 A 或羧肽酶 B 都不能使 C-末端氨基酸脱落下来。

(d) 用溴化氰(CNBr)处理, 得到两个肽。一个含有丝+色+脯; 另一个肽含有全部剩余的氨基酸(包括第二个丝氨酸)。

(e) 用糜蛋白酶处理, 得到三个肽。一个只含有丝+脯; 另一个只含有蛋+色; 第三个含有苯丙+赖+丝+精+丙。

(f) 用胰蛋白酶处理, 得到三个肽。其中一个只含丙+精; 另一个只含有赖+丝; 第三个含有苯丙+色+蛋+丝+脯。

解:

(a) FDNB 与自由氨基反应, 水解后产生 DNP-氨基酸衍生物。这样, N-末端氨基酸是丙氨酸。赖氨酸是在链的内部, 而它的 ϵ -氨基是自由的, 因而这个肽是直链的, 不是环状。

(b) 羧肽酶 A 能切断所有 C-末端氨基酸, 精氨酸、赖氨酸或脯氨酸除外。羧肽酶 B 只能切断 C-末端精氨酸或赖氨酸。如果倒数第二个氨基酸是脯氨酸, 则这两种酶对任何 C-末端氨基酸都不起作用。用这两种酶处理后得不到产物, 说明脯氨酸是最后一个或倒数第二个残基。

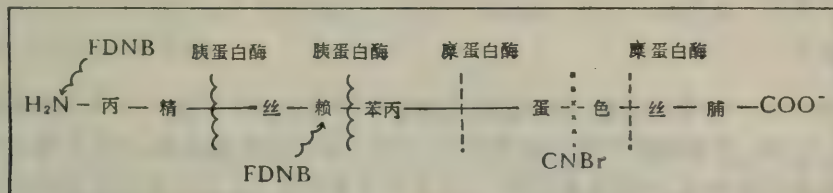
注意: 羧肽酶将继续切断对羧肽酶敏感的 C-末端氨基酸, 因此, 我们真正要测的乃是鉴定释放最快的那个氨基酸。

(c) 溴化氰专门切断蛋氨酸残基的羧基端(该蛋氨酸就转化为高丝氨酸)。到目前为止数据提示了 CNBr 解裂下来的三肽是 C-末端肽(含有脯氨酸)。因而, 最后的四个残基包括有蛋氨酸, 然后是色氨酸、丝氨酸和脯氨酸(但最后这三个氨基酸的排列顺序仍不清楚)。

(d) 糜蛋白酶切断苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和亮氨酸的羧基端, 如果紧接在后的残基(供给氨基的)不是脯氨酸。糜蛋白酶处理所得的二肽之一的成分确定了原始肽的 C-末端是蛋-色-丝-脯。在蛋氨酸之前的氨基酸一定是苯丙氨酸(它是唯一易受糜蛋白酶作用的剩余残基)。因此, 末端的顺序是苯丙-蛋-色-丝-脯。

(e) 胰蛋白酶切断赖氨酸和精氨酸的羧基端, 倘若紧接在后的氨基酸(供给氨基的)不是脯氨酸, 由于丙氨酸是 N-末端, 所以始端的排列顺序一定是丙-精-丝-赖。

全部氨基酸的顺序如下:



如果另一个主要的多肽碎片是蛋-色-丝-脯-谷-谷-苏-亮-缬-甘, 那么蛋-色-丝-脯的重叠部分意味着氨基酸的顺序为丙-精-丝-赖-苯丙-蛋-色-丝-脯-谷-谷-苏-亮-缬-甘。

例题 2-4

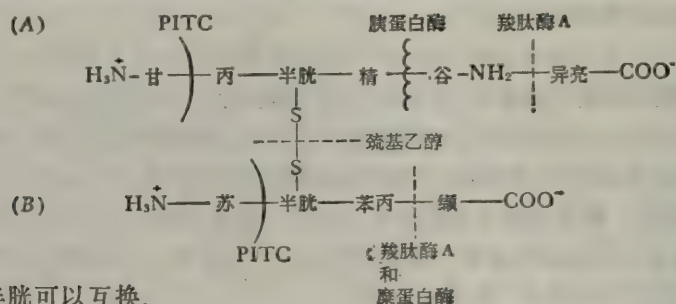
某肽经完全酸解后, 产生甘+丙+2 半胱+精+谷+异亮+苏+苯丙+缬+ NH_4^+ 。用巯基

乙醇还原开始的肽,然后用碘醋酸把半胱氨酸残基烷基化,生成两个较小的肽(A和B)。根据以下资料提出开始肽的适当结构:

- A 肽:** (a) 含有丙+甘+半胱+谷+精+异亮+ NH_4^+ ,
 (b) 羧肽酶 A 使异亮氨酸游离出来,
 (c) 以异硫氰酸苯酯(PITC, Edman 试剂)处理,产生甘氨酸的苯乙内酰硫脲衍生物(PTH-甘氨酸),
 (d) 用胰蛋白酶处理,产生两个肽,一个含有谷氨酸盐+异亮氨酸+ NH_4^+ ,另一个含有甘+丙+半胱+精。
- B 肽:** (e) 含有苏+缬+半胱+苯丙,
 (f) 羧肽酶 A 使缬氨酸游离出来,
 (g) 糜蛋白酶使缬氨酸和含有半胱+苏+苯丙的三肽游离出来,
 (h) 用 Edman 法降解,产生 PTH-苏氨酸。

解:

Edman 试剂作用于自由氨基而释放出 PTH-氨基酸衍生物。巯基乙醇还原双硫键。碘醋酸使 SH 基烷基化,从而阻止了再氧化作用。酸水解产生的 NH_4^+ 一定来自酰胺,因而,谷氨酸盐可能以谷氨酰胺形式存在。开始的肽可能有如下的结构:



A 肽中的丙和半胱可以互换。

肽和蛋白质的多样性

下面的例题说明二十种氨基酸可组成种类繁多的多肽和蛋白质,以及由之形成的多种多样的分析图谱。

例题 2-5

由三个不同的 L- α -中性氨基酸,可以组成多少个不同的直链状三肽, (a) 三个氨基酸可用于任意位置, (b) 每一个氨基酸只能在链中使用一次? (c) 从定性角度看,包括全部三个氨基酸的各种氨基酸分析图谱,可能有多少种? (d) 从定性角度看, (a) 中计算出的在各种可能三肽总数中,独特的氨基酸分析图谱能有多少种? (e) 从定量角度看, (a) 中计算出的各种可能三肽总数中,独特的氨基酸分析图谱能有多少种?

解:

(a) 第一个位置有三种可能性,因为三个氨基酸中的任一个都可以用于任一位置,第二个位置也有三种可能性,而第三个位置也有三种可能性。因而,各种可能三肽的总数是 $3 \times 3 \times 3 = 27$, 这三个氨基酸是 a、b、c, 可将其表示如下:

	第二个位置是 a	第二个位置是 b	第二个位置是 c
第一个位置的 氨基酸是 a	$\left\{ \begin{array}{l} a a a \\ a a b \\ a a c \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} a b a \\ a b b \\ a b c \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} a c a \\ a c b \\ a c c \end{array} \right.$
第一个位置的 氨基酸是 b	$\left\{ \begin{array}{l} b a a \\ b a b \\ b a c \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} b b a \\ b b b \\ b b c \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} b c a \\ b c b \\ b c c \end{array} \right.$
第一个位置的 氨基酸是 c	$\left\{ \begin{array}{l} c a a \\ c a b \\ c a c \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} c b a \\ c b b \\ c b c \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} c c a \\ c c b \\ c c c \end{array} \right.$

一般说来,从 n 个物体中,每次取 r 个,其各种直链状排列总数为

$${}_nN_r^B = n^r \quad (2)$$

这里 n 个物体中的任一个都可以重复使用 r 次。在这个例子中 $n=3$, $r=3$ 。所以, ${}_3N_3^B = 3^3 = 27$ 。

(b) 如果每一个氨基酸在链中只能用一次,那么第一个位置有三个可能性,第二个位置有两个可能性,而第三个位置只有一个可能性。这样全部三种氨基酸的不同三肽总数是 $3 \times 2 \times 1 = 6$ 。表示如下:

a 在第一位置	b 在第一位置	c 在第一位置
a b c	b a c	c a b
a c b	b c a	c b a

一般说来,从 n 个物体中每次取 r 个的全部排列数目或有序配置为

$${}_nP_r = n(n-1)(n-2) \cdots (n-r+1) \quad (3)$$

式中, n 等于 r 或大于 r (排列中的 r 个物体每一个都不相同)。假如全部 n 个物体都参加了排列,则

$${}_nP_n = n! \quad (4)$$

在本例题中有三种氨基酸而每次取三个。

$$\therefore {}_3P_3 = 3! = 3 \times 2 \times 1 = 6$$

(c) 显而易见,(b)中所示的 6 种排列只可能有一种图谱。然而一般说来,从 n 个物体中每次取 r 个,其组合的数目为

$${}_nC_r = \frac{n!}{r!(n-r)!} \quad (5)$$

式中, n 等于 r 或大于 r (排列中的 r 个物体每一个都不相同)。在(b)中所示的全部 6 种排列代表着相同的组合,当 $n=3$, $r=3$ 时,

$${}_3C_3 = \frac{3!}{3!(3-3)!} = \frac{3!}{(3!)(0!)} = \frac{3 \times 2 \times 1}{(3 \times 2 \times 1)(1)} = 1$$

(记住: $0! = 1$.)

(d) 如果将(a)中所示的 27 个三肽,每一种都进行水解,并使之通过氨基酸分析仪,我们将看到只有 7 种独特的定性组成图谱。

(1) 只有 a(来自 aaa),

- (2) 只有 b(来自 bbb),
 (3) 只有 c(来自 ccc),
 (4) a+b(来自 aab, aba, abb, baa, bab, bba),
 (5) a+c(来自 aac, aca, acc, caa, cac, cca),
 (6) b+c(来自 bbc, bcb, bcc, cbb, cbc, ccb),
 (7) a+b+c(来自 abc, acb, bac, bca, cab, cba).

一般说来,独特的定性图谱总数等于 n 个物体全部组合的总数,物体取法为每次取 1 个, 2 个, 3 个……一直到取 r 个,这里 n 等于 r 或大于 r . 当 n 等于 r 或小于 r 时(如本例题),则独特的定性图谱总数同样等于从 n 个物体中每次取 1 个, 2 个,……一直取 n 个组合数的总数。

$${}_nC_n^3 = 2^n - 1 \quad (6)$$

以 $n=3$, 方程式(5)要运算三次(以 $r=1, 2$ 和 3)得到 $3+3+1=7$. 用方程式(6)计算得到 $2^3-1=8-1=7$.

(e) 关于(a)中所示的 27 个三肽,有些得到同样的定量图谱。例如: aab, aba 和 baa 都是每摩尔 b 产生 2 摩尔 a, 而没有 c. 总共有 10 种不同的定量图谱。

	摩 尔 比 率		
	a:	b:	c:
(1)	3	0	0
(2)	0	3	0
(3)	0	0	3
(4)	2	1	0
(5)	0	2	1
(6)	2	0	1
(7)	1	2	0
(8)	1	0	2
(9)	0	1	2
(10)	1	1	1

一般说来,从 n 个物体中,每次取 r 个,所得各种定量图谱的总量为

$${}_nN_r = \frac{(n+r-1)!}{r!(n-1)!} \quad (7)$$

如 $n=3$ 和 $r=3$:

$${}_3N_3 = \frac{(3+3-1)!}{3!(3-1)!} = \frac{5!}{3!2!} = \frac{5 \times 4 \times 3 \times 2}{3 \times 2 \times 2} = 10$$

将方程式(2)至(7)*用于直链状十二肽(12 个氨基酸),我们将会发现,如每种氨基酸用 12 次[方程式(2)], 20 种氨基酸可形成 4.09×10^{15} 不同的直链状十二肽。如果每种氨基酸只用一次[方程式(3)], 则只能形成 6.03×10^{13} 种十二肽。在 6.03×10^{13} 种十二肽中只有 125,970 种独特的组合[方程式(5)]. 其余的再提出不同次序的相同组合。在 4.096×10^{15} 种不同的十二肽中,不同的氨基酸定性分析图谱有 9.106×10^5 个[方程式(5)], 每一氨基酸用 12 次,不同的氨基酸定量分析图谱有 1.41×10^8 个[方程式(7)**]。

* 原文为“方程式(2)至(6)”应为方程式(2)至(7)之误——译者注。

** 原文为“方程式(6)”应为方程式(7)之误——译者注。

蛋白质构象

肽键的四个原子和两个相邻的 α -碳原子分布在一个平面上。H 原子和 O 原子交替地分布在链的两侧(图 2-1)。肽键是刚硬的,但这个平面可以围绕 α -碳原子转向,两个相邻的 α -碳原子间的距离为 3.6 \AA , 于是,含有 100 个氨基酸残基的多肽键完全延伸时,其长度可达 3600 \AA 。

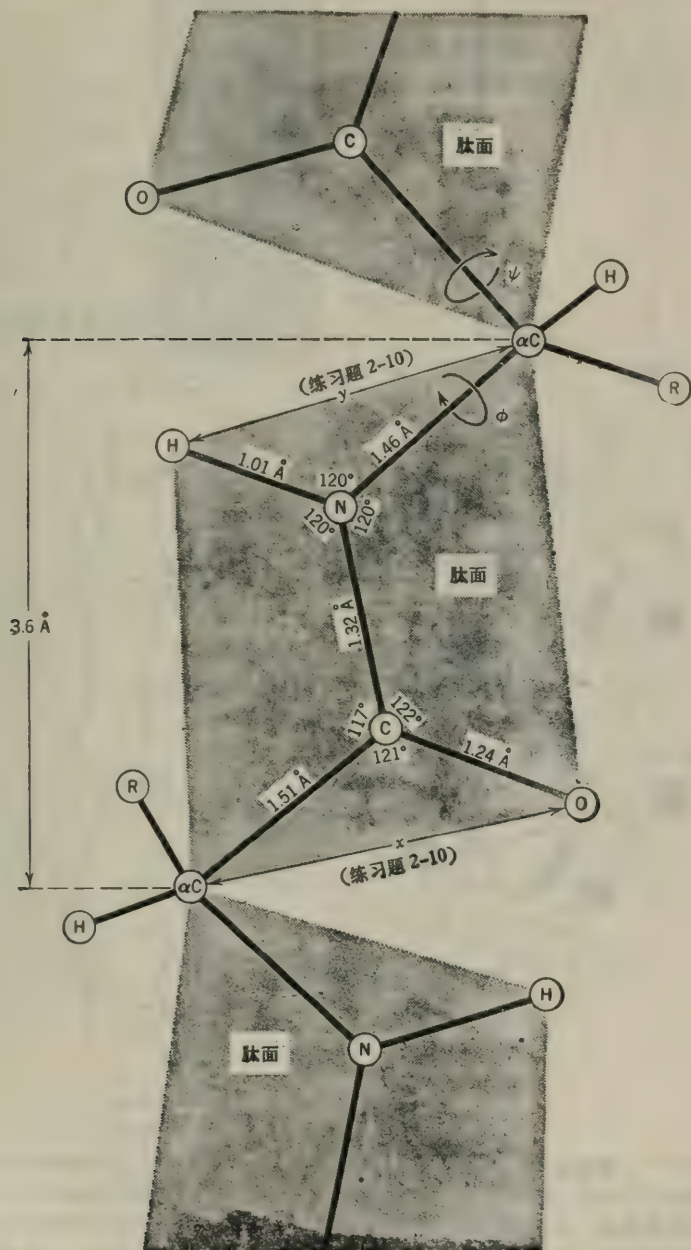


图 2-1 肽键是刚硬的,并固定在一个平面。这些平面可围绕 α -碳原子旋转。旋度由 ϕ 和 ψ 角度表示。

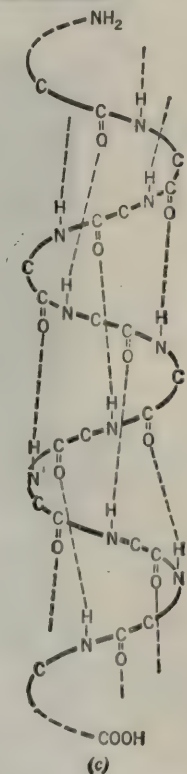
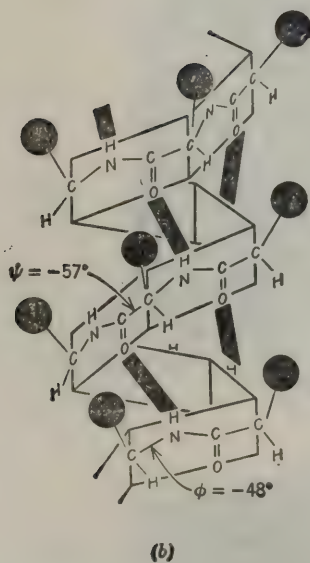
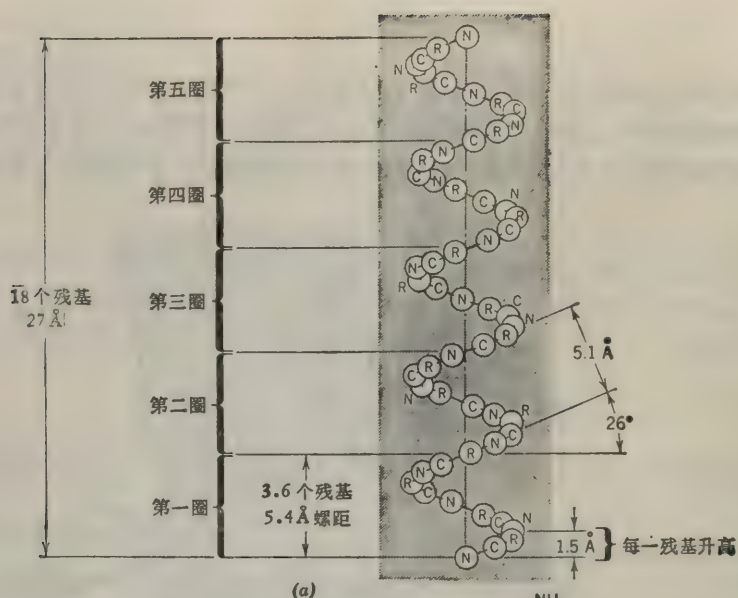


图 2-2 α -螺旋的三种表示法。此螺旋每个残基上升 1.5 Å，每 3.6 个残基绕一整圈，其螺距为 5.4 Å。当 NH₂ 末端位于顶端时，每个 C=O 与下数四个残基的一个 NH 以氢键相连。(a) 复制自 E. E. Conn 和 P. K. Stumpf, *Outlines of Biochemistry*. Wiley (1972). R 代表 α -碳。(b) 复制自 R. Barker, *Organic Chemistry of Biological Molecules*. Prentice-Hall (1971). (c) 复制自 K. D. Kopple, *Peptides and Amino Acids*. Benjamin (1966). 为了清楚起见， α -碳的 R-基没有标出。

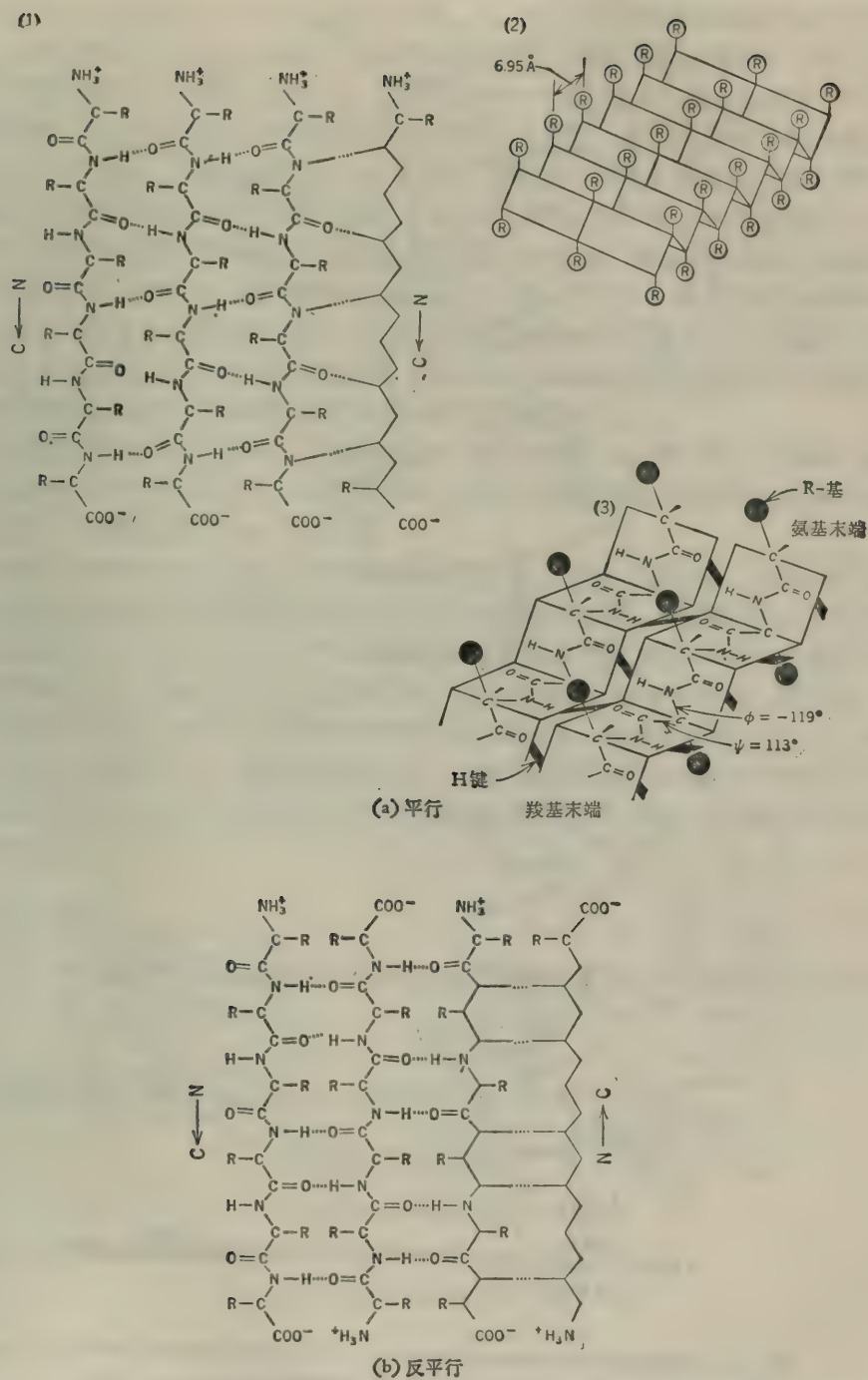


图 2-3 (a)平行的 β 结构的三种表示法。(3)复制自 Barker(1971)。(b)反平行的 β 结构。

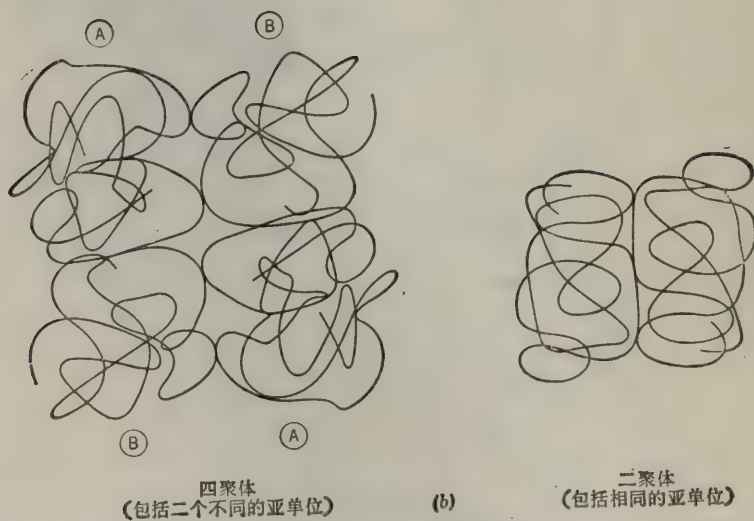
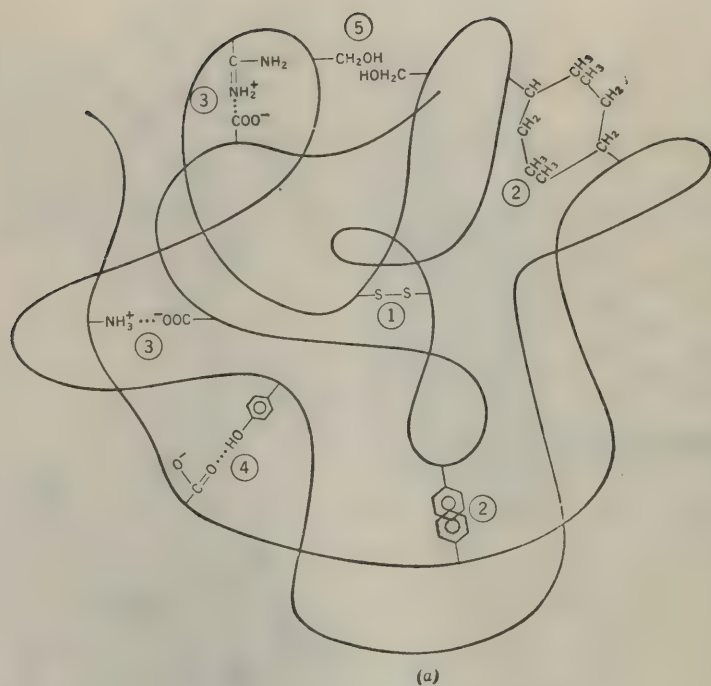


图 2-4 (a)蛋白质的三级结构的稳定是由于(1)两个半胱氨酸残基的氧化作用而形成的共价双硫键;(2)疏水的相互作用;(3)离子的相互作用(盐键);(4)氢键和(5)偶极-偶极相互作用。(b)三级结构的亚基联合而形成一个二聚体和一个四聚体(四级结构)。一个低聚物的亚基常常是不同的。

线型多肽链随其所含 R-基性质的差别而呈现为一些不同的二级结构。常见的结构称为 α -螺旋结构 (图 2-2)。这是一种右旋性螺旋, 每圈 3.6 个氨基酸残基 (右旋性螺旋可拟为右手握拳, 拇指伸出, 指向螺旋进行方向, 其它四指即表示该螺旋的转动方向。因此, 当右旋性螺旋按逆时针方向盘绕时, 其前进方向为向上)。 α -螺旋的螺距为 5.4 \AA , 即螺旋每转一圈则沿轴上升 5.4 \AA 。肽链中每一肽键的 $\text{C}=\text{O}$ 和第四个残基肽键的 NH 间形成的链内氢键, 使 α -螺旋结构稳定 (如将 H 定为第一个原子, 那么与氢键相连的氧就是链上第 13 个原子。因此, 称该盘绕为 3.6_{13} 螺旋)。两个或两个以上相连的残基上带有同样的电荷时 (如: 赖氨酸、谷氨酸), 或两个或两个以上相连残基的 β -碳上伸出有庞大的 R-基时 (如: 异亮氨酸、丝氨酸、缬氨酸), 都会阻止了 α -螺旋的形成。在这些情况下, 该多肽链可能呈现为无规则的线圈结构。脯氨酸不能参与形成 α -螺旋, 因其 N 原子位于刚硬环内。于是就不可能有环绕着 α -碳原子的旋转。另外, 在脯氨酸残基的 N 原子上没有氢原子, 因而不能形成链内的氢键。连续的丝氨酸残基以 OH 基与 H 键有强烈相吸的倾向, 而破坏了 α -螺旋。脯氨酸和丝氨酸的延伸盘绕成不同于 α -螺旋的螺线排列。

重复排列的具有小而紧密 R-基的氨基酸 (如: 甘氨酸、丙氨酸) 终止了形成 β 或折叠板结构, 该结构由平行 [图 2-3(a)] 或反平行 [图 2-3(b)] 的靠链内氢键连接的多肽链组成。蚕丝就是反平行折叠板结构中的一例。

大多数非纤维状蛋白质具有非常精密的和紧凑的三维或三级结构, 这是由于多肽链的 α -螺旋和无规则线圈本身的弯曲、缠绕和来回地折叠而形成的。氨基酸 R-基的相互作用使使三级结构稳定 [图 2-4(a)], 因之, 三级结构受初级结构的支配。蛋白质的生化功能与其三级结构紧密地相连系, 这就是说, 蛋白质要行使某方面的功能必需有相应的三级结构。反过来说, 只有某一特异的三级结构才使蛋白质最佳地体现出某一特异的功能 (见图 4-3 和 4-4)。

许多蛋白质还具有另一级结构的复杂性, 通过三级结构亚基的非共价聚合而形成的四级结构 [图 2-4(b)], 通常只是由于这种四级结构的蛋白质 (二聚体、四聚体等等) 才显示出它完全的活性。

例题 2-6

(a) 计算一个含有 78 个氨基酸的 α -螺旋的轴长? (b) 此多肽的 α -螺旋完全伸展时有多长?

解:

(a) α -螺旋每 3.6 个残基上升 5.4 \AA (或每个残基上升 1.5 \AA)。

$$\therefore \frac{5.4 \text{ \AA}}{3.6 \text{ 残基}} = \frac{1.5 \text{ \AA}}{1 \text{ 个残基}} = \frac{\text{长度}}{78 \text{ 个残基}}$$

$$\text{长度} = (78) (1.5 \text{ \AA}) = 117 \text{ \AA}$$

(b) 在完全伸展的链中, 残基间的距离为 3.6 \AA 。

$$\therefore \text{长度} = (78) (3.6 \text{ \AA}) = 280.8 \text{ \AA}$$

例题 2-7

某氨基酸残基的平均分子量为 120。某可溶性蛋白质的平均密度为 1.33 克/厘米^3 。计算 (a) 可溶性蛋白质的平均比容。 (b) 含有 270 个氨基酸的某蛋白质, 其单个分子的重量和 (c)

这个蛋白质的单个分子占有的体积, (d) 这个蛋白质的一个分子能否完全适合于在 100 \AA 厚的细胞膜内? 设该分子为球形。

解:

(a) 比容(\bar{v})是密度的倒数(1.0克物质占有的毫升数)。

$$\bar{v} = \frac{1}{\rho} = \frac{1}{1.33} = 0.75 \text{ 毫升/克}$$

(b) $MW = (270)(120) = 32,400$

\therefore 1摩尔重 32,400 克。一摩尔含有 6.023×10^{23} 个分子, 因此, 单个分子的重量为

$$\text{重量}_{\text{克/分子}} = \frac{MW}{N} = \frac{32.4 \times 10^3}{6.023 \times 10^{23}} = 5.38 \times 10^{-20} \text{ 克/分子}$$

(c)

$$\begin{aligned} \text{体积}_{\text{毫升/分子}} &= \bar{v}_{\text{毫升/克}} \times \text{wt}_{\text{克/分子}} = \frac{\text{wt}_{\text{克/分子}}}{\rho_{\text{克/毫升}}} = (0.75)(5.38 \times 10^{-20}) \\ &= 4.035 \times 10^{-20} \text{ 毫升/分子} \end{aligned}$$

通常, 一个分子的体积为

$$\text{体积} = \frac{MW\bar{v}}{N} = \frac{MW}{\rho N} \quad (8)$$

(d) 球形的体积是 $(4/3)\pi r^3$, r 为半径。

$$\text{体积} = 4.035 \times 10^{-20} \text{ 毫升} = 4.035 \times 10^{-20} \text{ 厘米}^3$$

$$4.035 \times 10^{-20} = \frac{4}{3} \pi r^3$$

$$r^3 = \frac{(3)(4.035 \times 10^{-20})}{(4)(3.142)} = 9.63 \times 10^{-21}$$

$$r = \sqrt[3]{9.63 \times 10^{-21}} = \sqrt[3]{9.63} \times \sqrt[3]{10^{-21}}$$

$$r = 2.13 \times 10^{-7} \text{ 厘米 或 } r = 21.3 \text{ \AA}$$

该分子直径为 42.6 \AA , 能适应于 100 \AA 厚的细胞膜内。

例题 2-8

大肠杆菌(*E. coli*)是一种杆状细菌。长约 2μ , 直径约 1μ 。细胞的平均密度为 1.28 克/毫升 。大肠杆菌的可溶性蛋白质大约占其湿重的 13.5% , 估算每个细胞的一种特殊的酶的分子数。设该酶的分子量为 $100,000$, 并占全部可溶性蛋白质的 0.1% 。

解:

大肠杆菌细胞(假设为柱形)的体积如下:

$$\text{体积} = \pi r^2 l$$

其中,

$$r = 0.5 \text{ 微米} = 5 \times 10^{-5} \text{ 厘米}$$

$$l = 2 \text{ 微米} = 2 \times 10^{-4} \text{ 厘米}$$

$$\text{体积} = (3.14)(5 \times 10^{-5})^2(2 \times 10^{-4})$$

$$= (3.14)(25 \times 10^{-10})(2 \times 10^{-4})$$

$$\text{体积} = 1.57 \times 10^{-13} \text{ 厘米}^3$$

单个大肠杆菌细胞的重量为

$$\text{重量} = \text{体积} \times \text{密度} = (1.57 \times 10^{-13})(1.28)$$

$$\text{重量} = 2 \times 10^{-12} \text{ 克}$$

单个细胞中酶的量是

$$13.5\% \times 0.1\% \times 2 \times 10^{-12} = (0.135) (10^{-13}) (2 \times 10^{-12}) \\ = 2.7 \times 10^{-16} \text{ 克}$$

$$\text{分子数目} = \frac{\text{wt}_{\text{克}} \times N}{\text{MW}}$$

其中, N = 阿佛加德罗常数,

$$\text{分子数目} = \frac{(2.7 \times 10^{-16}) (6.023 \times 10^{23})}{10^5} = 1626 \text{ 个分子/细胞}$$

总之

$$\text{每个细胞的分子数} = \frac{N \rho V f}{\text{MW}} \quad (9)$$

式中, N = 阿佛加德罗常数 = 6.023×10^{23} ,

ρ = 细胞的密度,

V = 细胞的体积,

f = 用化合物表示的细胞重量分数,

MW = 化合物的分子量.

例题 2-9

亮氨酸残基的比容为 0.9 毫升/克. 甘氨酸残基的比容为 0.64. 计算某合成多肽的比容和密度. 此合成多肽中, 亮氨酸残基占重量的 60%, 甘氨酸的残基占重量的 40%.

解:

肽或蛋白质的比容为

$$\bar{v}_P = \Sigma(\text{残基的重量分数} \times \text{残基的比容}) \quad (10)$$

注意: 使用重量分数以便答案为毫升/克蛋白质. 方程式(10)也可写为

$$\bar{v}_P = \frac{\Sigma(\bar{v}_{\text{残基}} \times \text{MW}_{\text{残基}})}{\text{MW}_P} \quad (11)$$

同样, 蛋白质的密度为

$$\rho_P = \Sigma(\text{残基体积分数} \times \text{残基的密度}) \quad (12)$$

这里用的是体积分数, 以取得蛋白质单位为克/毫升的答案. 我们已知重量分数, 所以用方程式(10):

$$\bar{v}_P = (0.60) (0.90) + (0.40) (0.64) = 0.54 + 0.256$$

$$\bar{v}_P = 0.796 \text{ 毫升/克} \quad \rho_P = \frac{1}{\bar{v}} = \frac{1}{0.796}$$

$$\rho_P = 1.256 \text{ 克/毫升}$$

例题 2-10

乳酸脱氢酶 (LDH) 是一个四聚体, 由叫做 M 和 H 的两种亚基组成的. 骨骼肌 LDH 的大部分为 MMMM. 心脏 LDH 的大部分为 HHHH. 其它组织则含有由 M 和 H 亚基组成的杂种同工酶. 不同的 LDH 同工酶可能有多少种? 假定这个亚基排列成四方形或四面体形, 因而就没有“顺序”的问题(如 HMMM 与 MMMH 相同).



四方形



四面体形

解:

LDH 的同工酶有五种可能: HHHH、HHHM、HHMM、HMMM 和 MMMM. 我们如果由方程式(7)计算是可以得到此数的, 方程式(7)从 n 个物体中取出 r 个为一组时, 从定量角度看, 其不同排列方式的总数为

$${}_nN_r = \frac{(n+r-1)!}{r!(n-1)!} = \frac{(2+4-1)!}{4!(2-1)!} = \frac{5!}{4!} = 5$$

由组分测分子量

根据氨基酸或辅基的分析来计算分子量, 是基于每摩尔蛋白质中至少含有一摩尔的任一残基这一简单的事实. 但任一给定的残基也可能大于一摩尔, 因之, 这个方法得到的是最小分子量.

例题 2-11

血红蛋白含铁的重量为 0.335%, 计算血红蛋白的最小分子量.

解:

每个血红蛋白分子至少含有一个 Fe 原子. Fe 的克原子重为 55.85 克. 因此, 血红蛋白的最小分子量就是含 55.85 克铁的血红蛋白的重量. 从另一个角度看这个问题, 即 55.85 克铁是蛋白质最小分子量的 0.335%.

或

$$\frac{100 \text{ 克蛋白质}}{0.335 \text{ 克铁}} = \frac{MW_{\text{最小}}}{55.85 \text{ 克铁}}$$

$$MW_{\text{最小}} = \frac{(100)(55.85)}{(0.335)}$$

$$MW_{\text{最小}} = 16,672$$

$$0.335\% \times MW_{\text{最小}} = 55.85$$

$$3.35 \times 10^{-3} \times MW_{\text{最小}} = 55.85$$

$$MW_{\text{最小}} = \frac{55.85}{3.35 \times 10^{-3}}$$

$$MW_{\text{最小}} = 16,672$$

总之

$$MW_{\text{最小}} = \frac{MW_{\text{组分}} \times 100}{\text{组分的}\%} \quad (13)$$

用物理方法测定指出其分子量大约为 65,000. 这样, 血红蛋白为一个四聚体, 每一个单体含一个铁.

例题 2-12

1.0 毫克纯酶的氨基酸分析给出 58.1 微克的亮氨酸 (MW=131.2) 和 36.2 微克的色氨酸 (MW=204.2). 此酶的最小 MW 是多少?

解:

依据亮氨酸的含量计算该酶的最小分子量如下:

$$\frac{10^{-3} \text{ 克酶}}{58.1 \times 10^{-6} \text{ 克亮氨酸}} = \frac{MW}{131.2}$$

$$MW_{\text{最小}} = 2258$$

依据色氨酸含量计算该酶的最小分子量如下:

$$\frac{10^{-3} \text{ 克酶}}{36.2 \times 10^{-6} \text{ 克色氨酸}} = \frac{MW}{204.2}$$

$$MW_{\text{最小}} = 5641$$

以上每种计算方法都是假定一分子酶中每种氨基酸只有一个残基。亮氨酸/色氨酸的摩尔比值为

$$\frac{58.1/131.2}{36.2/204.2} = \frac{0.443}{0.177} = \frac{2.5}{1}$$

在一个蛋白质的分子中每种氨基酸残基的数目必须是整数。因此,实际的比值为 5:2。那么实际的最小分子量则是含有 5 克亮氨酸残基和 2 克色氨酸残基的重量。

$$5 \times 2258 = 11,290$$

$$2 \times 5641 = 11,282$$

当然,假如一分子的酶含有(举例来说)25 个亮氨酸残基和 10 个色氨酸残基,那么真正的分子量约为 56,450。

用凝胶过滤法测分子量

凝胶过滤法是一种分子筛选方法,它可以根据分子的大小来将其分级。筛的介质是多孔凝胶,比如 Sephadex(交联葡聚糖),生物凝胶(聚丙烯酰胺)或可控-多孔玻璃球。凝胶可看作是有固定直径范围的网孔[图 2-5(a)],于是,比网孔小得多的分子能自由地通透凝胶。直径比那些最大的网孔还大得多的分子则完全排斥在凝胶之外。中等大小的分子可以进入一些凝胶颗粒内,但是,与很小的分子比较,在任何时间,占很大比例的中等大小分子是在凝

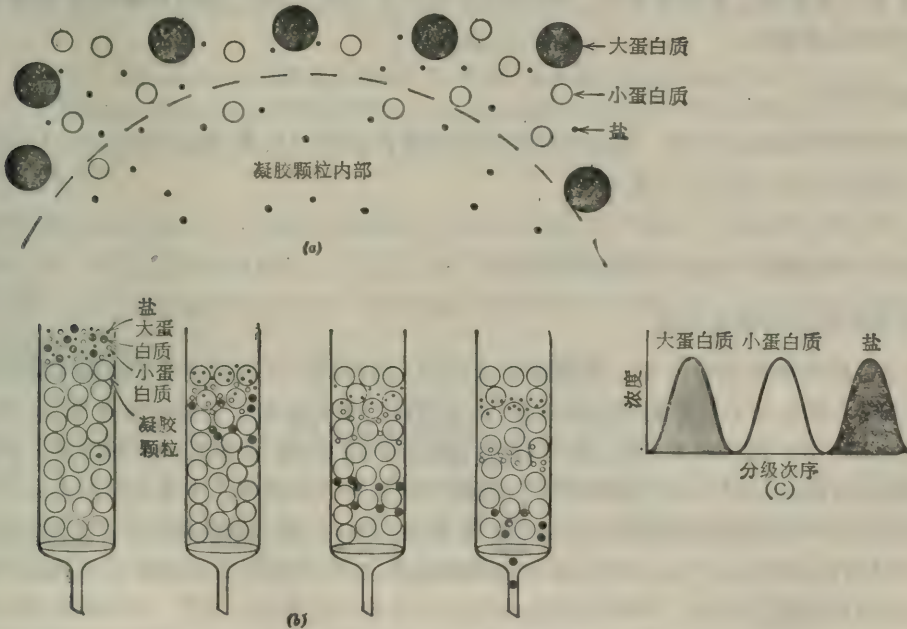


图 2-5 凝胶过滤法。(a)图解表示凝胶颗粒表面有给定大小范围的网孔。

(b)三种不同大小分子的分级分离法。(c)分级分离图。

胶之外。如图 2-5(b) 说明了凝胶过滤过程。将含有不同大小分子的小量某溶液放入装有凝胶的柱内,然后,用适当的缓冲液通过柱子洗该溶液。柱内液体总体积(V_t)为凝胶颗粒外部的液体体积(V_o)与颗粒内部液体体积(V_i)的总和: $V_t = V_o + V_i$ 。该溶液中的很大的分子只能流经柱子的 V_o 部分,因而首先从柱上洗脱下来[图 2-5(c)]。其次是中等大小的分子被洗脱下来。最小的分子必须流完 $V_o + V_i$,最后被洗脱下来。凝胶过滤法是测定蛋白质分子量最方便的方法。这种方法不要求用纯的、匀一的蛋白质,而只需要对从柱中流出的蛋白质进行检测的方法。

例题 2-13

(a) 当一个混合物含有:细胞色素 c(MW = 13,000)、色氨酸合成酶(MW = 117,000)、己糖激酶(MW = 96,000)、ATP 硫酸化酶(MW = 440,000)、葡萄糖氧化酶(MW = 154,000)和黄嘌呤氧化酶(MW = 300,000),流过排阻 MW 为 200,000 或更高分子量蛋白质的凝胶柱时,推测其洗脱顺序。(b) 除了分子量外,还有那些因素影响交联葡聚糖柱上蛋白质的洗脱体积 V_o ?

解:

(a) 蛋白质的洗脱顺序是由最大到最小。ATP 硫酸化酶和黄嘌呤氧化酶二者都被排阻,因此它们彼此不能分开,这两个酶将在体积等于 V_o 时洗脱下来。洗脱顺序为 ATP 硫酸化酶 + 黄嘌呤氧化酶、葡萄糖氧化酶、色氨酸合成酶、己糖激酶、细胞色素 c。

(b) 影响蛋白质洗脱体积(V_o)的两个主要因素是形状和氨基酸含量。同样分子量的非球形分子显得比球形分子大些,因此比预期更早地洗脱下来。蛋白质的疏水氨基酸残基可与 Sephadex 的葡聚糖互相作用。因之,疏水氨基酸高于平均值的蛋白质将比预期更晚地洗脱下来,该蛋白质显得比真实价为小。Sephadex 含有少量的 $-\text{COO}^-$ 基可能延迟碱性氨基酸含量高的蛋白质通过。

例题 2-14

估计白喉毒素蛋白的分子量。假设它刚好在血红蛋白的前面从校准的 Sephadex G-200 柱(图 2-6)洗脱下来,其 V_o/V_o 为 1.83。

解

V_o/V_o 为 1.83, 相当于分子量约为 71,000。

用 SDS 凝胶电泳法测分子量

十二烷基磺酸钠(SDS)是一种阴离子去污剂,对瓦解大多数多聚蛋白质的四级结构十分有效。许多 SDS 分子与亚基牢固地结合,从而遮蔽了蛋白质分子上原有电荷[图 2-7(a)]。因而,所有的 SDS-蛋白质复合物,在电泳时,都以同样的电荷/质量比向正极移动。假若电泳是在聚丙烯酰胺凝胶上进行,某个 SDS-蛋白质复合物的迁移率几乎完全取决于分子的大小。实际上,SDS 凝胶电泳法是以电场做为推动力,用以代替大量溶液流动的凝胶过滤法。因之,可以用已知单体分子量的蛋白质作出标准曲线[图 2-7(b)]。某未知蛋白质的分子量就可以比较容易地测定出来。SDS 凝胶电泳可以在非均匀的制剂上进行,如果能够指示出该蛋白质的位置那就很有意义了(例如,用特殊染色法显示该蛋白质,如果该蛋白质是酶,则用特殊染色法显示其反应产物中的一种)。

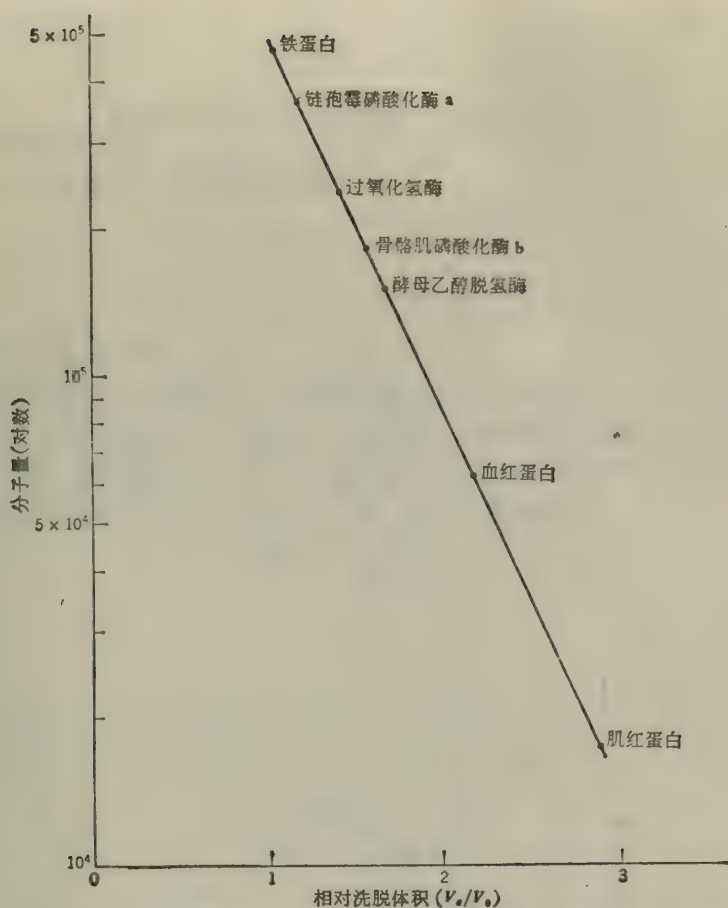


图 2-6 Sephadex G-200 凝胶滤柱的校准。 V_e/V_0 表示给定蛋白质的洗脱体积相对于完全排阻在凝胶之外的很大的分子的洗脱体积。标准蛋白质大约为球型并具有平均的氨基酸含量。

例题 2-15

骨骼肌糖原磷酸化酶 a 从校准的生物凝胶 P-300 柱上洗脱下来时，它的位置相当于分子量为 360,000。SDS 凝胶电泳测出分子量为 90,000。将磷酸化酶 a 的酶法水解样品进行微生物分析，揭示出每毫克蛋白质有 1.86 微克吡多醛 (MW=167.2)。关于磷酸化酶 a 的结构能得出什么结论？

解：

$$\frac{1.86 \times 10^{-6} \text{ 微克吡多醛}}{1.0 \times 10^{-8} \text{ 克磷酸化酶}} = \frac{167.2}{\text{MW}_{\text{最小}}}$$

$$\text{MW}_{\text{最小}} = 89,392$$

累积的结果启示，磷酸化酶 a 是一种四聚物 (MW=360,000)，由相同的分子量 (90,000) 的四个亚基组成，而且每个亚基含有一个吡多醛基。

用渗透压法测分子量

当溶液和纯溶剂用一个允许溶剂通过而不允许溶质通透的膜隔开时，溶剂分子透过膜

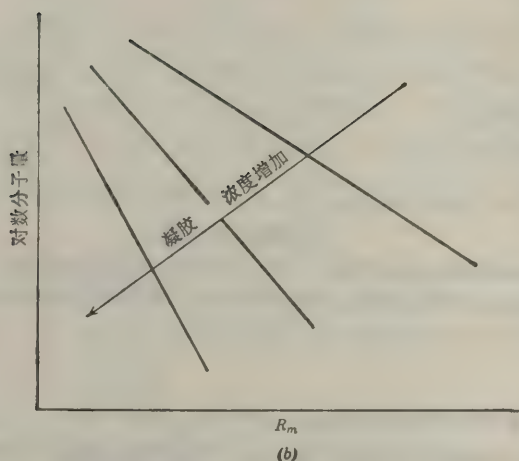
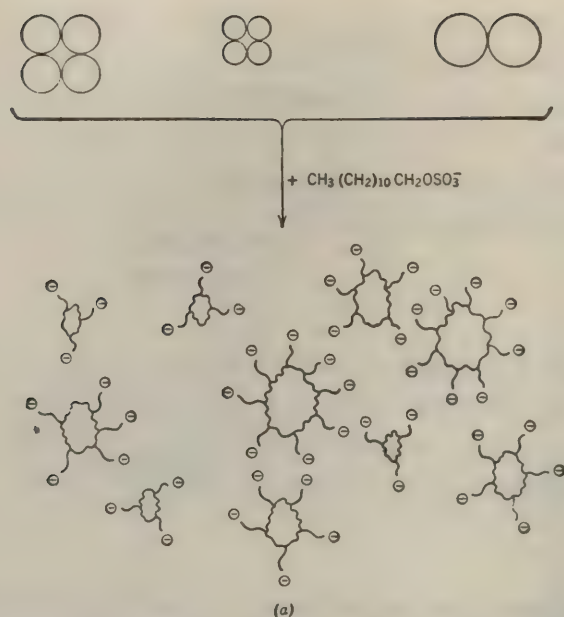


图 2-7 (a) SDS 对蛋白质四级结构的破坏作用。SDS 与亚基牢固地结合，遮蔽了蛋白质分子的原有电荷。实际上，所有形成的 SDS-蛋白质复合物都具有同样的电荷/质量比。(b) SDS 凝胶电泳的标准曲线。 R_m 表示有关“前沿”的迁移率(mm)，该“前沿”通常是一个带有负电荷的染料，如溴酚蓝。

进入溶液范围[图 2-8(a)]。该用以防止溶剂分子通过所需的压力称为渗透压(π)。溶液的渗透压取决于溶质的浓度和溶液的温度，其关系(如下所示)与气体的 PVT 关系相同。

$$\pi V = nRT \quad (14)$$

式中， π = 渗透压，以大气压为单位，

V = 溶液的体积，以升为单位，

n = 溶质的摩尔数，

R = 气体常数。为 0.0821 升-大气压/摩尔-°K，

T = 绝对温度。

$$\pi = \frac{n}{V} RT$$

$$\therefore \pi = MRT \quad (15)$$

式中, M = 溶液的摩尔浓度。

溶质的分子量可通过 π 的测量而确定。

$$\pi V = \frac{wt_{\text{克}}}{MW} RT \quad MW = \frac{wt_{\text{克}} RT}{V \pi}$$

$$\therefore MW = \frac{CRT}{\pi} \quad (16)$$

式中, C = 浓度, 以克/升表示。

只有极稀的溶液(其中颗粒之间或颗粒与溶剂之间没有相互作用)才遵守 $\pi V = nRT$ 的这种关系。然而, 要获得良好的 π 的测量, 必须使用较浓的溶液。通常对所观察到的 π 值必须校正其非理想性。其作法是以 π/C (还原渗透强度或比渗透强度) 对 C 作图, 并将曲线外推到 C 为零时, 即得 $(\pi/C)_{C \rightarrow 0}$, 将此值代入下式, 即可求得分子量。

$$MW = \frac{RT}{(\pi/C)_{C \rightarrow 0}} \quad (17)$$

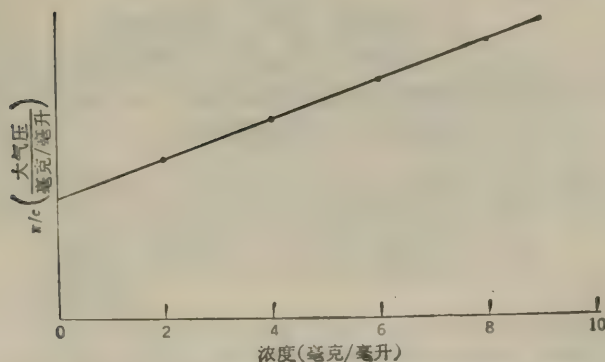
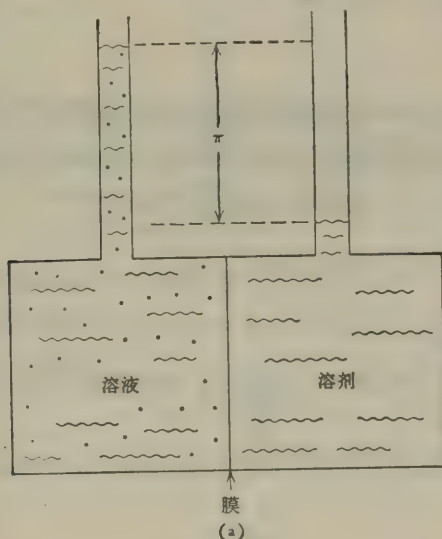


图 2-8 (a) 静态渗透压计; (b) 对溶液非理想性的校正。

例题 2-16

在 10°C 时, 某蛋白质溶液浓度为 4 毫克/毫升时其渗透压为 3.05×10^{-3} 大气压, 该溶液浓度为 2 毫克/毫升时其渗透压为 1.40×10^{-3} 大气压, 计算分子量。

解:

数据与 π/C 值列表如下:

C	π	π/C
4 毫克/毫升	3.05×10^{-3}	7.625×10^{-4}
2 毫克/毫升	1.40×10^{-3}	7.000×10^{-4}
\therefore 在 0 毫克/毫升	—	6.375×10^{-4}

C 减少 2 毫克/毫升时, π/C 减少 0.625×10^{-4} 。因此, 在无限稀释情况下, π/C 值将为 6.375×10^{-4} [实践中, 将会得到许多 π 值和标绘的 π/C 值, 如图 2-8(b) 所示]。

$$\text{MW} = \frac{RT}{(\pi/C)_{C \rightarrow 0}} = \frac{(0.0821)(283)}{6.375 \times 10^{-4}}$$

$$\text{MW} = 36,446$$

用沉降速度法测分子量

蛋白质或其它大分子物质的分子量可用超速离心方法求得。其原理相当简单, 分子量高的分子比分子量低的分子沉降得快些, 扩散得慢些, Svedberg 方程式表示了这一关系。

$$\text{MW} = \frac{RTs}{D(1 - \bar{v}\rho_s)} \quad (18)$$

式中, R = 气体常数 (8.314×10^7 尔格 \times 摩尔 $^{-1} \times$ 度 $^{-1}$),

T = 绝对温度 ($^{\circ}\text{K}$),

D = 扩散系数 (厘米 2 /秒)

= 在单位浓度梯度下 (即在膜的一侧较另一侧浓度高 $1M$), 每秒扩散通过 1 厘米 2 面积的化合物数量,

\bar{v} = 大分子物质的比容 (为其密度的倒数) $^{1)}$,

ρ_s = 溶剂的密度,

s = 沉降系数 (秒)。

$$s = \frac{dx/dt}{\omega^2 x} \quad \text{或} \quad s = \frac{2.3 \log x}{t \omega^2} \quad (19)$$

式中, dx/dt = 移动界面的沉降速度 [图 2-9(a)、(b)],

x = 任何时间 (t), 从旋转中心到界面的距离,

ω = 角速度 (弧度/秒)。

沉降系数以秒为单位。实际上, s 表示的另外一种说法是

$$\text{速度} = \text{加速度} \times \text{时间} \quad \text{或} \quad \text{时间} = \frac{\text{速度}}{\text{加速度}}$$

1) 实际上, \bar{v} 代表溶质的偏微比容 (partial specific volume), 即由于加入了 1 克溶质而引起的溶液体积的增加。如果在与溶剂相互作用中, 溶质的结构没有特殊的改变, \bar{v} 可认为是各种亚基比容分数的总和或溶质各种组分比容分数的总和, 如例题 2-9 所述。

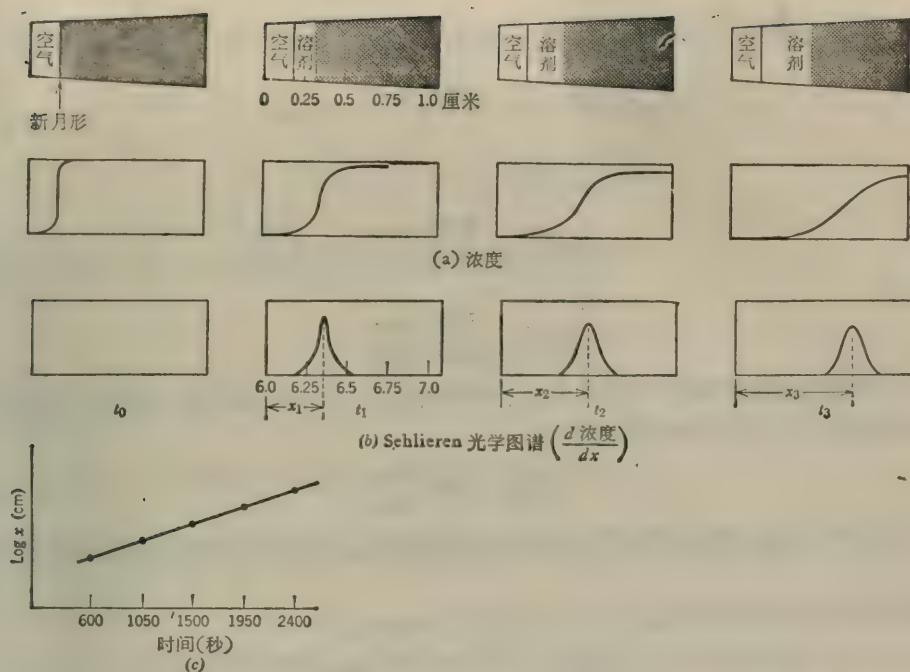


图 2-9 沉降速度的测定。(a) 在离心杯中蛋白质的分布为离心时间的函数。蛋白质向右边沉降。(b) Schlieren 光学图谱。该光学系统测量溶液中折射指数的变化, 因之, 这个图谱绘出的是蛋白质沿沉降方向的浓度梯度。(c) $\log x$ 对时间的作图, x 为已移动的界面的距离(即从月面到 Schlieren 图谱尖峰的距离)。

式中, 速度 $= dx/dt$,

在离心场内的加速度 $= \omega^2 x = (\text{弧度/秒})^2 \times \text{厘米}$ 。

在不同时间里测定界面的位置, 并以 $\log x$ 对时间作图[图 2-9(c)], 可以得到沉降常数。这个图形的斜率为 $\log x/t$, 因此,

$$s = \frac{2.3(\text{斜率})}{\omega^2} \quad (20)$$

假如离心机的转动是以每分钟的转数(RPM)表示的, 那么从下式可得到以每秒弧度表示的 ω :

$$\omega = \frac{\text{RPM}}{60} (2\pi) \quad (21)$$

因为一圈(圆的一周)为 2π 弧度。为了方便起见, s 通常用 Svedberg 作单位来表示, 而 $1s = 10^{-13}$ 秒。如果此 s 值是在 20°C 水溶液中测定的, 则用符号 $s_{20, \omega}$ 表示。扩散系数(D)必须从独立的实验中获得。

Svedberg 方程式的导出是基于这样的事实, 在离心力场中, 由于分子以一定速度沉降, 结果使离心力 F_o 恰好等于浮力 F_b 与摩擦力(阻力) F_f 之和。

$$F_o = F_b + F_f \quad \text{或} \quad F_o - F_b = F_f$$

式中, $F_o - F_b$ 可看作是净离心力:

$$\text{净 } F_o = m_{\text{有效}} \alpha = m_{\text{有效}} \omega^2 x$$

$m_{\text{有效}}$ 是分子的有效质量, 即: 分子的真实质量减去等体积的溶剂质量(为分子所取代的)。

$$m_{\text{有效}} = (\text{体积}_p \times \text{密度}_p) - (\text{容积}_p \times \text{密度}_s) = \text{体积}_p (\rho_p - \rho_s) = \frac{(\text{MW}) \bar{v}}{N} (\rho_p - \rho_s)$$

$$\therefore \text{净 } F_o = \frac{(\text{MW}) \bar{v} \omega^2 x}{N} (\rho_p - \rho_s)$$

$$\bar{v} = \frac{1}{\rho_p}$$

$$\therefore \text{净 } F_o = \frac{(\text{MW}) \omega^2 x}{N} (1 - \bar{v} \rho_s) \quad (22)$$

摩擦力为

$$F_f = \frac{RT}{DN} \frac{dx}{dt} \quad (23)$$

式中, N 为阿佛加德罗常数, dx/dt 为分子的沉降速度, D 为扩散常数, 它必须单独测定. D 只是 Fick 第一扩散定律中的比例常数.

$$\frac{dc}{dt} = DA \frac{\delta c}{\delta x} \quad (24)$$

Fick 第一定律表明某物质穿过面积 A 而扩散时, 其速度与该面积两侧的浓度梯度成正比.

由方程式(22)和(23)得到

$$\frac{(\text{MW}) \omega^2 x}{N} (1 - \bar{v} \rho_s) = \frac{RT}{DN} \frac{dx}{dt}$$

或

$$\text{MW} = \frac{RT \frac{dx}{dt}}{D \omega^2 x (1 - \bar{v} \rho_s)} = \frac{RT s}{D (1 - \bar{v} \rho_s)} \quad (25)$$

实际上, s 值应在蛋白质的几个不同浓度下测定, 并外推至零浓度.

例题 2-17

超速离心机的转速为 58,000 RPM 时, (a) 计算 ω 以每秒的弧度表示, (b) 计算距旋转中心 6.2 厘米处的离心力, (c) 这个离心力相当于重力“g”的多少倍?

解:

$$(a) \quad \omega = \frac{\text{RPM}}{60} (2\pi) = \frac{(58,000) (2) (3.14)}{60}$$

$$\omega = 6070.7 \text{ 弧度/秒}$$

$$(b) \quad \alpha = \omega^2 x = (6070.7)^2 (6.2) = (36.85 \times 10^6) (6.2)$$

$$\alpha = 2.284 \times 10^8 \text{ 厘米/秒}^2$$

注意, 弧度没有单位, 因为它只是弧长对半径长的比值.

(c) 地球的吸力场 = $g = 980 \text{ 厘米/秒}^2$

$$\alpha = \frac{2.284 \times 10^8}{980} = 233.061 \times g$$

例题 2-18

在 20°C 时, 人的血清清蛋白的扩散系数为 $6.1 \times 10^{-7} \text{ 厘米}^2/\text{秒}$, 其沉降系数为 4.6s. 水在

20°C 时的密度为 0.998。计算该清蛋白的分子量, 假定它在 20°C 时的比容为 0.74。

解:

$$\begin{aligned}
 MW &= \frac{RTs}{D(1-v\rho_s)} = \frac{(8.314 \times 10^7) (293) (4.6 \times 10^{-13})}{(6.1 \times 10^{-7}) [1 - (0.74) (0.998)]} \\
 &= \frac{11.205 \times 10^{-3}}{(6.1 \times 10^{-7}) (0.2615)} = \frac{11.205 \times 10^{-3}}{1.595 \times 10^{-7}}
 \end{aligned}$$

$$MW = 70,258$$

也可参看例题 6-28, 关于用亲合标记法测定分子量的叙述。

B. 碳水化合物

例题 2-19

己醛糖可能有多少个不同的立体异构体(不包括 α , β 异构体)?

解:

立体异构体的数目决定于所含的不对称碳原子的数目, 对于非相似末端 (nonlike-ended) 分子来说:

$$\text{立体异构体的数目} = 2^n \tag{26}$$

式中, n = 不对称碳原子的数目。对直链型的己醛糖来说有四个不对称碳原子: 第 2、3、4 和 5。

$$\text{立体异构体的数目} = 2^4 = 16$$

一半为 D-糖 (OH 在第 5 个碳原子的右边); 另一半为 L-糖 (OH 在第 5 个碳原子的左边)。在形成环状结构时, 出现了第 5 个不对称碳原子, 因而 16 个糖中的每一个都有 α 和 β 异构体。

例题 2-20

含有 D-吡喃半乳糖和 D-吡喃葡萄糖不同结构的双糖可能有多少种?

解:

含有吡喃环型的半乳糖和葡萄糖的双糖可能有 20 种。

半乳糖苷: 1—2, 1—3, 1—4 和 1—6	= 4
α 或 β 式连接	$\therefore \times 2$
	<hr/> = 8
葡萄糖苷: 1—2, 1—3, 1—4 和 1—6	= 4
α 或 β 式连接	$\therefore \times 2$
	<hr/> = 8
非还原的双糖: α — α , α — β , β — α 和 β — β	= 4
1—1 连接	

$$\text{总计: } 20$$

对比之下, 两个中性氨基酸只能形成两种不同的二肽; 而一个酸性氨基酸和一个碱性氨基酸只能形成四个不同的二肽。一般地单糖大约有 20 种 (包括氨基糖、糖醛酸和糖的其它衍生物)。因之, 在多糖中变化性的潜力甚至比蛋白质还要大。但是, 在自然界中发现的所有多糖几乎都由少于五种不同单糖的重复单位所组成。

例题 2-21

大肠杆菌糖原的样品 25 毫克, 以 2 毫升 $2\text{NH}_2\text{SO}_4$ 水解. 水解液中和后, 再稀释到 10 毫升. 最终溶液的葡萄糖含量为 2.35 毫克/毫升. 分离出的糖原纯度是多少?

解:

水解后所得葡萄糖量为

$$2.35 \text{ 毫克/毫升} \times 10 \text{ 毫升} = 23.5 \text{ 毫克}$$

$$\frac{23.5 \text{ 毫克}}{180 \text{ 毫克/毫摩尔}} = 0.1306 \text{ 毫摩尔}$$

该糖原样品含有 0.1306 毫摩尔葡萄糖. 但是, 当葡萄糖(或任何其它单糖)聚合时, 每形成一个糖苷键通常要失去 1 摩尔的 H_2O , 因此, 一个葡萄糖残基的分子量为 $180 - 18 = 162$. 所得葡萄糖的量相当于:

$$0.1306 \text{ 毫摩尔} \times 162 \text{ 毫克/毫摩尔} = 21.16 \text{ 毫克糖原}$$

糖原的纯度为
$$\frac{(21.16)(100)}{25} = 84.6\%$$

(或此样品没有完全水解.)

例题 2-22

准确称取糖原 81.0 毫克, 将其完全甲基化, 然后再用酸水解. 用薄层层析法分离和鉴定甲基化产物. 得到的 2,3-二甲基葡萄糖恰好是 62.5 微摩尔. (a) 分支点占全部葡萄糖残基的百分数是多少? (b) 甲基化和水解后还有那些其它产物? 每一种有多少?

解:

(a) 葡萄糖的总量是

$$\frac{81 \times 10^{-3} \text{ 克}}{162 \text{ 克/摩尔}} = 5 \times 10^{-4} \text{ 摩尔} = 500 \text{ 微摩尔}$$

2,3-二甲基葡萄糖是来自分支点(图 2-10) 因此,

$$\text{分支点的 \%} = \frac{62.5}{500} \times 100 = 12.5\%$$

(b) 每有 1 摩尔分支点就有 1 摩尔非还原末端基(NRE).

$$\therefore \text{2,3,4,6-四甲基葡萄糖的微摩尔数} = 62.5$$

每 n 个分支点残基实际有 $n+1$ 个 NRE 残基(分子). 但是, 象糖原这样的高分子量的分子, 在 $n+1$ 与 n 个残基间的摩尔差别是无意义的(这一点在下面的例题中将更详细地阐明).

葡萄糖不以二甲基葡萄糖或四甲基葡萄糖出现, 而以三甲基葡萄糖出现.

$$\therefore \text{2,3,6-三甲基葡萄糖的微摩尔数} = 500 - (2 \times 62.5) = 500 - 125$$

$$\text{2,3,6-三甲基葡萄糖的微摩尔数} = 375$$

例题 2-23

在上一例题中说过的糖原其分子量为 3×10^6 . (a) 一个分子的这种糖原含有多少个葡萄糖残基? (b) 在分支点上有多少个残基? (c) 有多少个残基在非还原末端上?

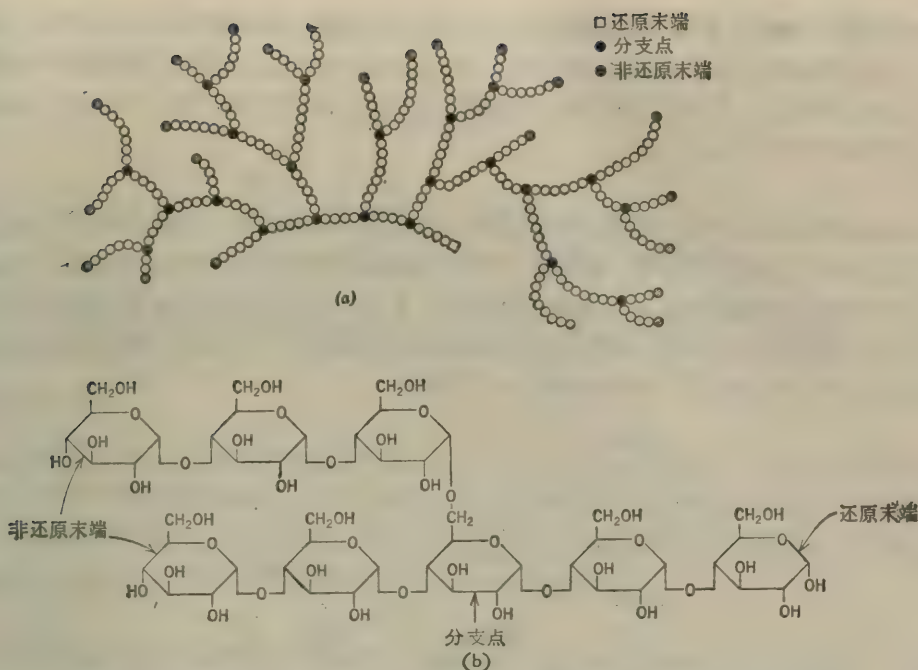


图 2-10 (a)糖原或支链淀粉的分支结构。(b)糖原或支链淀粉的节略结构。每一个自由 OH 基可用硫酸二甲酯甲基化。水解后,分支点产生 2,3-二甲基葡萄糖。非还原末端基(NRE)水解后产生 2,3,4,6-四甲基葡萄糖。分子的还原末端(RE)转化为 1,2,3,6-四甲基葡萄糖,但是在糖苷键水解时,在 1-碳上的甲基以甲醇形式脱落(其它甲基以稳定的醚存在)。这样 RE 和所有其余的 1—4 相连残基就形成 2,3,6-三甲基葡萄糖。水解产物上的自由 OH 基说明该 OH 是用于形成环或在单糖残基间形成糖苷键。

解:

(a)

$$\frac{3 \times 10^6 \text{ 克/摩尔糖原}}{162 \text{ 克/摩尔葡萄糖残基}} = 18,519 \text{ 摩尔葡萄糖/摩尔糖原} \\ = 18,519 \text{ 葡萄糖残基/分子糖原}$$

(b) 残基中有 12.5% 为分支点。

$$(0.125)(18,519) = 2315 \text{ 分支点残基/分子}$$

(c) n 个分支点残基中有 $n+1$ 个 NRE 个残基。

$$\therefore n+1 = 2316 \text{ NRE 残基/分子}$$

因之, 81 毫克的糖原代表:

$$\frac{81 \times 10^{-3} \text{ 克}}{3 \times 10^6 \text{ 克/摩尔}} = 2.7 \times 10^{-8} \text{ 摩尔} = 0.027 \text{ 微摩尔糖原}$$

而 $(0.027)(18,519) = 500$ 微摩尔的葡萄糖(总)

包括 $(0.027)(2315) = 62.505$ 微摩尔的分支点

和 $(0.027)(2316) = 62.532$ 微摩尔的 NRE

因此, 上一例题中所作的分支点的摩尔数 = NRE 的摩尔数的假设是完全有根据的。

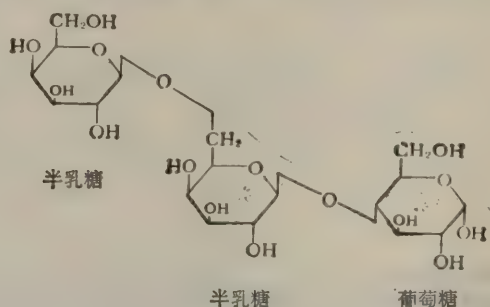
例题 2-24

从牛奶中分离出来的三糖由 β -半乳糖苷酶完全水解为半乳糖和葡萄糖, 其比率为 2:1。将

原有的三糖用 NaBH_4 还原, 继而使其完全甲基化、酸水解, 然后再进行一次 NaBH_4 还原步骤, 最后用醋酸酐乙酰化, 得到三种产物: (a) 2, 3, 4, 6-四甲基-1, 5-二乙酰基-半乳糖醇, (b) 2, 3, 4-三甲基-1, 5, 6-三乙酰基-半乳糖醇, 和 (c) 1, 2, 3, 5, 6-五甲基-4-乙酰基-山梨醇。这个三糖的结构是什么?

解:

甲基化以前的还原作用可以把还原性末端残基转换成开链的糖醇, 这就使甲基化作用可以在第 1 位和第 5 位进行。因此, 葡萄糖(它产生山梨醇衍生物)是在还原性末端。甲基化以后的还原作用和水解作用打开了其它单糖的环。新的 OH 基(用于连接其它糖的 OH 基也一样)于是也能乙酰化。因此, 假定这三个残基全是吡喃环型, 该原始三糖最可能的结构是半乳糖($\beta 1 \rightarrow 6$)半乳糖($\beta 1 \rightarrow 4$)葡萄糖, 如下所示:



例题 2-25

用高碘酸处理 200 毫克纤维素样品, 能释放出 4.12 微摩尔的甲酸。(a) 此纤维素分子的平均分子量是多少? (b) 一个纤维素分子的平均链长是多少?

解:

(a) 高碘酸(IO_4^-)切断具有可氧化官能团的碳原子间的键。在此过程中, 这些碳原子被提升到氧化状态。因之, 一个乙二醇转变为两个醛基, 与醇基相邻的醛基转变成甲酸, 而醇基氧化成醛基。含有三个相邻醇基的链产生二个醛基和一个甲酸。实际上, 中间的醇基是分两

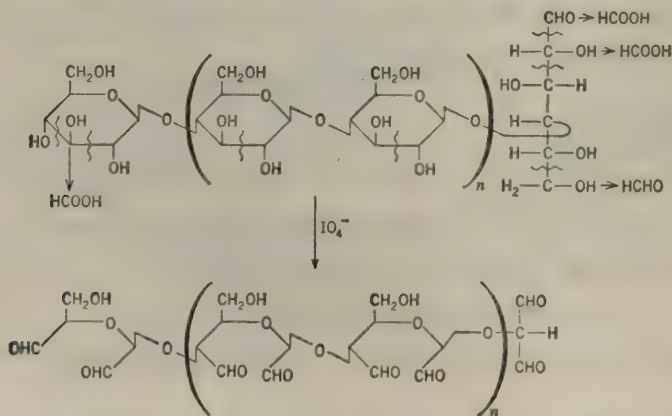


图 2-11 纤维素的高碘酸氧化作用。每一链产生三个分子的甲酸。
为了清楚起见, 还原末端残基以开放链形式表示。

步氧化。纤维素是一个线形(无分支)的多聚物,由葡萄糖残基以 $\beta 1 \rightarrow 4$ 键组成。每个链产生三个分子的甲酸,如图 2-11 所示。因此,200 毫克纤维素相当于

$$\frac{4.12}{3} = 1.373 \text{ 微摩尔纤维素}$$

$$MW = \frac{wt_{克}}{\text{摩尔数}}$$

$$MW = \frac{200 \times 10^{-3}}{1.373 \times 10^{-6}} \quad MW = 145,666$$

$$(b) \quad \text{每一个链的葡萄糖残基数} = \frac{\text{纤维素分子量}}{\text{葡萄糖残基分子量}} = \frac{145,666}{162} = 899$$

例题 2-26

500 毫克的糖原样品,用放射性氰化物($KC^{14}N$)处理。被结合的 $O^{14}N^-$ 恰好是 0.193 微摩尔。另一个 500 毫克糖原样品,用含有 3% HCl 的甲醇处理,使之形成还原末端的甲基葡萄糖苷(甲醇不能甲基化其它 OH 基)。然后,用高碘酸处理这个甲基葡萄糖苷,所产生的甲酸恰好是 347 微摩尔。计算(a)糖原的分子量和(b)分支的程度。

解:

(a) 氰化物加到还原末端的第一个碳原子的“醛基”上,由于糖原每分子仅仅含有一个还原末端残基,所以,加上的 ON^- 的摩尔数与糖原的摩尔数相等。因此,500 毫克的糖原为 0.193 微摩尔。

$$MW = \frac{wt_{克}}{\text{摩尔数}} = \frac{500 \times 10^{-3}}{0.193 \times 10^{-6}} \\ MW = 2.59 \times 10^6$$

(b) 甲基化抑制了高碘酸对第一个碳原子的还原末端残基的氧化作用。因而所形成的全部甲酸都是来自 NRE 残基的第三个碳。因此,347 微摩尔的甲酸表明了有 347 微摩尔的 NRE 残基(和 347 微摩尔的分支点残基)的存在。

$$\text{总葡萄糖} = \frac{500 \times 10^{-3} \text{ 克}}{162 \text{ 克/摩尔残基}} = 3.086 \times 10^{-3} \text{ 摩尔} = 3086 \text{ 微摩尔}$$

$$\text{分支点 \%} = \frac{347}{3086} \times 100 = 11.24\%$$

参阅第五章 C 节有关旋光方面的问题。

C. 脂 类

例题 2-27

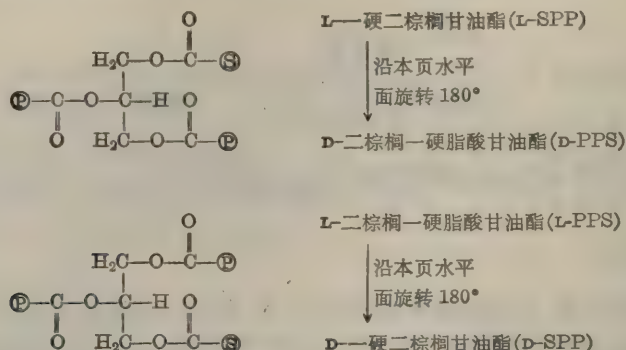
(a) 由甘油和三种不同的脂肪酸(例如月桂酸、棕榈酸和硬脂酸)可形成多少“不同的”甘油三酯? (b) 从定量的角度看,由甘油和三种不同的脂肪酸可以形成多少不同的甘油三酯?

解:

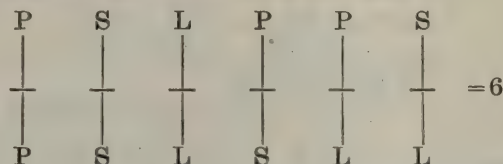
(a) 如前面所做的计算,从三个氨基酸能形成不同的三肽的总数一样(例题 2-5),我们可以推断:

$${}_3N_r^* = n^r = 3^3 = 27$$

然而,当两个不同的脂肪酸在甘油的第一和第三个位置上酯化时,对称的甘油分子中间的碳原子变成不对称的了。因此,我们可以向自己提问,例如: L-硬二棕榈酸甘油酯和 L-二棕榈一硬脂酸甘油酯是否真有区别? 它们的结构表示如下:



这就清楚地表明了 L-SPP 与 L-PPS 确实是有区别的。然而, L-SPP 与 D-PPS 是一样的, 而 L-PPS 与 D-SPP 也是一样的。因之, 甘油三酯确实可能存在 27 种, 可把它们看成是 27 个不同的 L-甘油三酯或 27 个不同的 D-甘油三酯。如果只计算 D-L 对的一种, 那么, 其数目比 27 种不同的可能性要少一些。在这种情况下, 可把 SPP 看做是与 PPS 一样的。换句话说, 27 种不同的 L 型甘油三酯中, 有些 L 型是另外一些 L 型的对映体 (D 型)。特别是末端取代基的 6 种不同组合可形成 18 种不同的甘油三酯如下:



其中, P=棕榈酸, S=硬脂酸, L=月桂酸。上述六种定量上不同的结构中, 每一种在 2 位或 β 位上都可以是三个脂肪酸中的任一个 ($6 \times 3 = 18$)。一般说来, 不同的甘油三酯的总数 (不包括对映体), 可以从方程式 (7) 中推出:

$$N = \left(\frac{(n+r-1)!}{r!(n-1)!} \right) n = \frac{n(n+1)!}{2(n-1)!} = \frac{n^3+n^2}{2} \quad (27)$$

式中, n =可用的脂肪酸数目,

$r=2$ (二个末端)。

(b) 用方程式 (7), $r=3$, 可以得到定量上不同的组成的总数:

$$\begin{aligned}
 N_r &= \frac{(n+r-1)!}{r!(n-1)!} = \frac{(n+2)!}{3!(n-1)!} = \frac{5 \times 4 \times 3 \times 2}{3 \times 2 \times 2} \\
 N &= 10
 \end{aligned}$$

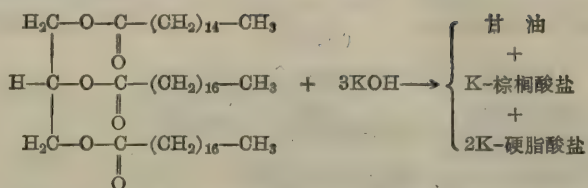
部分 (a) 中的甘油三酯比计算的要少些, 因为 18 种不同的甘油三酯中有一些具有相同的定量的组成 (如 PSS 与 SPS)。

例题 2-28

计算一棕榈二硬脂甘油酯的皂化值?

解:

一棕榈二硬脂甘油酯的皂化反应如下:



皂化一摩尔的甘油三酯需要三摩尔的 KOH。皂化值的定义是皂化 1.0 克甘油三酯所需 KOH 的毫克数。

KOH 的分子量 = 56

一棕榈二硬脂甘油酯的分子量 = 862

∴ 皂化 862 克甘油三酯所需的 KOH = (3)(56) = 168 克。

$$\frac{168 \times 10^3 \text{ 毫克 KOH}}{862 \text{ 克甘油三酯}} = 194.9 \text{ 毫克 KOH/克甘油三酯}$$

或

皂化值 = 194.9

例题 2-29

250 毫克纯橄榄油样品, 完全皂化需要 47.5 毫克的 KOH。计算橄榄油中甘油三酯的平均分子量。

解: 所需 KOH 的数量 = $\frac{47.5 \times 10^{-3} \text{ 克}}{56 \text{ 克/摩尔}} = 8.482 \times 10^{-4} \text{ 摩尔}$

每一摩尔甘油三酯需要 3 摩尔的 KOH。

$$\therefore \text{甘油三酯的含量} = \frac{8.482 \times 10^{-4}}{3} = 2.827 \times 10^{-4} \text{ 摩尔}$$

$$\text{摩尔数} = \frac{\text{wt}_{\text{克}}}{\text{MW}} \quad \text{或} \quad \text{MW} = \frac{\text{wt}_{\text{克}}}{\text{摩尔数}}$$

$$\text{MW} = \frac{250 \times 10^{-3}}{2.827 \times 10^{-4}} \quad \text{MW} = 884$$

或, 一般来说,

$$\text{MW}_{\text{平均}} = \frac{3 \times 56 \times 1000}{\text{皂化值}} = \frac{168,000}{\text{皂化值}} \quad (28)$$

橄榄油的皂化值为

$$\frac{47.5 \text{ 毫克 KOH}}{0.250 \text{ 克油}} = 190$$

$$\text{MW}_{\text{平均}} = \frac{168,000}{190} = 884$$

例题 2-30

使上述例题中的橄榄油与碘反应。680 毫克的该油吸收的 I_2 恰好为 578 毫克。(a) 一个甘油三酯的分子中平均有多少个双键? (b) 该油的碘值是多少?

解:

(a) 计算一摩尔油吸收 I_2 的摩尔数目。每一摩尔 I_2 加到一个双键上。

$$\frac{0.578 \text{ 克 } I_2}{0.680 \text{ 克油}} = \frac{\text{wt}_{\%} I_2}{884 \text{ 克油}}$$

$$\text{吸收的 } I_2 \text{ 的 } \text{wt}_{\%} = \frac{(884)(0.578)}{(0.680)} = 751.4 \text{ 克 } I_2/\text{摩尔油}$$

$$I_2 \text{ 的分子量} = (2)(126.9) = 253.8$$

$$\frac{751.4 \text{ 克 } I_2}{253.8 \text{ 克/摩尔}} = 2.96 \text{ 摩尔 } I_2/\text{摩尔油}$$

因之, 平均来说, 每一分子的甘油三酯有三个双键。

(b) 碘值的定义为每 100 克油或脂肪能吸收多少克碘。

$$\text{碘值} = \frac{751.4}{884} \times 100 = 85$$

例题 2-31

由太平洋珊瑚虫分离出一种酸性的、具有前列腺素活性的脂溶性有机化合物。元素分析给出 C 为 67.80%、H 为 9.60% 和 O 为 22.60%。问 (a) 最简单的实验式是什么和 (b) 该化合物的最小分子量是多少?

解:

某化合物最简单的实验式可由元素组成的数据计算。计算是基于这样的事实, 即化合物一个分子至少含有所存在的每种元素的一个原子。一旦知道了最简单的实验式, 最小分子量就可以按照所有存在元素的原子量之和来计算。

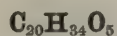
(a) 首先, 将所存在的每种元素的百分组成除以该元素的原子量, 得到每 100 克化合物中每种元素的克原子数。

$$\begin{array}{lll} \text{C} = \frac{67.80}{12} & \text{H} = \frac{9.60}{1} & \text{O} = \frac{22.60}{16} \\ \text{C} = 5.65 & \text{H} = 9.60 & \text{O} = 1.41 \end{array}$$

其次, 用最小的相对数值去除每一个相对的摩尔数。

$$\begin{array}{lll} \text{C} = \frac{5.65}{1.41} & \text{H} = \frac{9.6}{1.41} & \text{O} = \frac{1.41}{1.41} \\ \text{C} = 4 & \text{H} = 6.8 & \text{O} = 1 \end{array}$$

每种所存在的元素的原子数必须为整数。因之, 最简单的实验式可能是: $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}$ 。但是, 如果元素分析是十分准确的, 则可用整数乘 4:6.8:1 这个比值, 一直到所有的数都是整数为止。在此例中可用 5 乘, 得到



(b) 最小分子量为 $(20)(12) + (34)(1) + (5)(16) = 354$

例题 2-32

将上一例题所叙述的未知化合物 12 毫克, 溶于 0.8 克纯樟脑中。此溶液的冰点为 176.8°C 。纯樟脑的冰点为 178.4°C 。樟脑的重摩 (molal) 冰点下降常数为 37.7°C 。计算该未知化合物的表观分子量。

解:

在 1000 克溶剂中溶解一摩尔溶质 (溶液为一重摩浓度) 所降低的冰点即为重摩冰点降低常

数 (K_f)。任何溶液的冰点下降的度数 ($\Delta T_{f.p.}$) 与溶质的重摩浓度成正比。

$$\frac{\text{溶质 MW}_{\text{克}}/1000 \text{ 克溶剂}}{K_f} = \frac{(1000) \text{ wt}_{\text{克}} \text{ 溶质} / \text{wt}_{\text{克}} \text{ 溶剂}}{\Delta T_{f.p.}}$$

或

$$\text{MW}_{\text{溶质}} = \frac{(1000) (K_f) \text{ wt}_{\text{克}} \text{ 溶质}}{(\Delta T_{f.p.}) \text{ wt}_{\text{克}} \text{ 溶剂}} \quad (29)$$

$$\text{MW} = \frac{(1000) (37.7) (12 \times 10^{-3})}{(178.4 - 176.8) (0.8)} = \frac{452.4}{(1.6) (0.8)}$$

$$\text{MW} = 353.4$$

因此, 所得的分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_5$ 是对的, 冰点下降具有依数性——它取决于所含溶质的质点数。假如此溶质在溶剂中解离, 则计算所得的分子量的数值就偏低。

例题 2-33

一种匀一的膜制剂的密度为 1.15。膜蛋白质的平均密度为 1.30 克/厘米³。膜脂类的平均密度为 0.92 克/厘米³。膜中蛋白质与脂类的重量百分比是多少?

解:

如方程式(10)所示:

$$\bar{v}_{\text{膜}} = (\text{蛋白质的重量分数} \times \bar{v}_{\text{蛋白质}}) + (\text{脂类重量分数} \times \bar{v}_{\text{脂类}})$$

$$\bar{v}_{\text{膜}} = \frac{1}{1.15} = 0.87 \quad \bar{v}_{\text{蛋白质}} = \frac{1}{1.30} = 0.77 \quad \bar{v}_{\text{脂类}} = \frac{1}{0.92} = 1.09$$

设 X = 蛋白质重量分数, $\therefore (1 - X)$ = 脂类的重量分数。

$$0.87 = (0.77X) + 1.09(1 - X) = 0.77X + 1.09 - 1.09X$$

$$0.22 = 0.32X \quad X = \frac{0.22}{0.32}$$

$$\text{蛋白质的重量分数} = 0.688 \quad \text{或} \quad 68.8\% \text{ 蛋白质}$$

$$\text{脂类的重量分数} = 1.000 - 0.688$$

$$= 0.312 \quad \text{或} \quad 31.2\% \text{ 脂类}$$

D. 核苷酸与核酸

例题 2-34

由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 提纯出含有 15.1% (按摩尔计算) 腺嘌呤的 DNA 样品。其它碱基的百分数是多少?

解:

大多数双股 DNA 都含有等摩尔数的腺嘌呤和胸腺嘧啶和等摩尔量的鸟嘌呤和胞嘧啶, 即 $A = T$ 和 $G = C$ 。

$$\therefore \text{假如 } A = 15.1\%, \text{ 则 } T = 15.1\%$$

和

$$G + C = (100 - 30.2)\% = 69.8\%$$

$$G = 34.9\% \quad \text{和} \quad C = 34.9\%$$

在一些生物体中, 5-甲基胞嘧啶或 5-羟甲基胞嘧啶代替了一部分胞嘧啶。 $A = T$ 和

$G=C$, 以及 $A+C=G+T$ (氨基的总和等于酮基的总和) 的事实, 以及结合用 X-衍射研究的结果得出了 DNA 是一个由氢键稳定的双螺旋(图 2-12) 的概念。

例题 2-35

(a) 计算分子量为 3×10^7 的双股 DNA 分子的长度。 (b) 这种 DNA 一分子占有的体积是

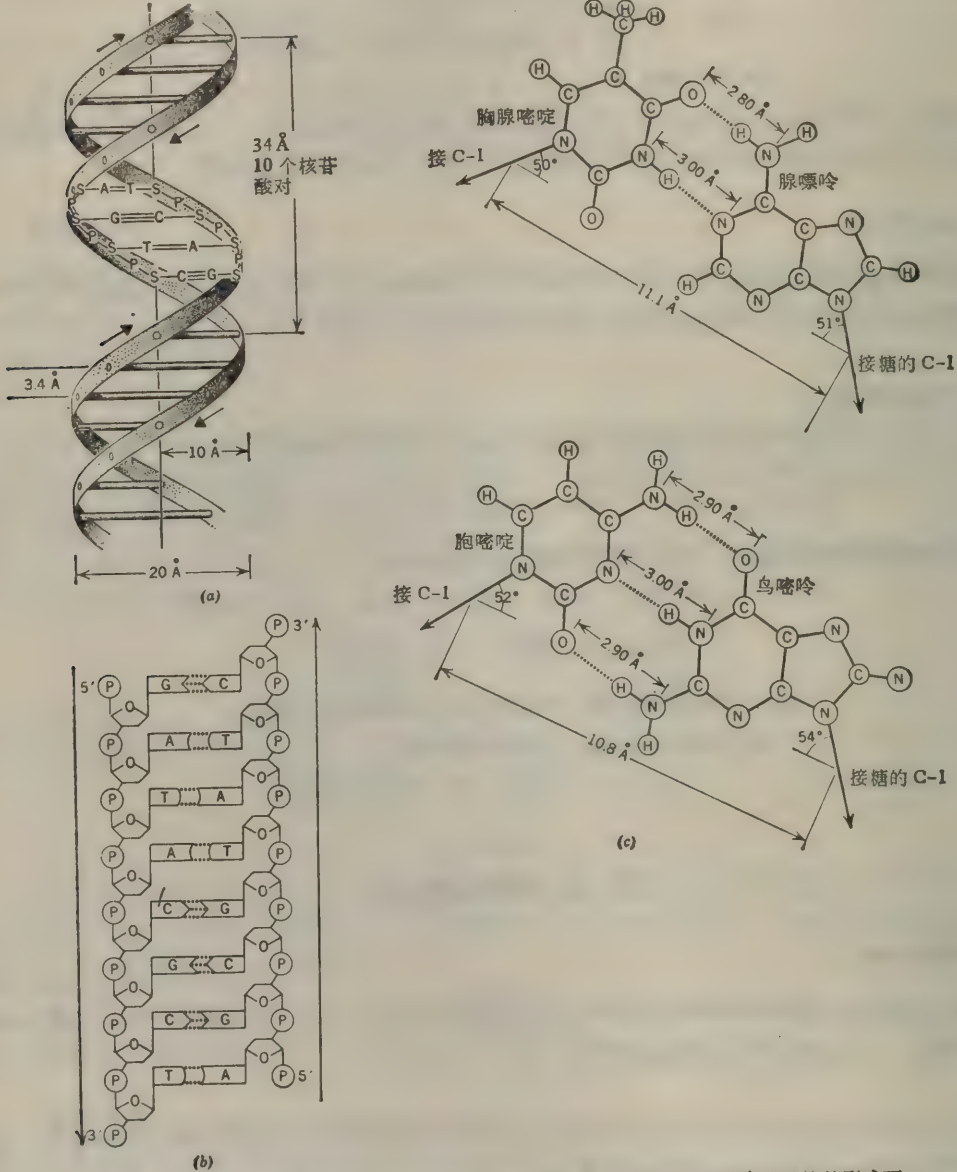


图 2-12 (a) 大多数生物体的 DNA 都以双股的、围绕着共同轴而盘旋的右旋螺旋的形式而存在。(b) 这双螺旋是由两个通往两个相反方向的(反平行的)多核苷酸链组成。碱基伸向双螺旋内部。(c) A-T 和 G-C 对之间的氢键以及碱基(“碱基堆 base stacking”)之间的非极性垂直相互作用, 使反平行线的结构稳定。[(a) 复制自 E. E. Conn and P. K. Stumpf 的 *Outlines of Biochemistry*. Wiley (1972); (b) 和 (c) 复制自 J. R. Bronk, *Chemical Biology*. Macmillan (1973)]。

多少? (c) 这种 DNA 一分子含有多少螺圈? 参看图 2-12.

解:

(a) 一个互补成对的脱氧核苷酸残基的平均分子量约为 618, 因此, 这个 DNA 含有

$$\frac{3 \times 10^7 \text{ 克/摩尔 DNA}}{618 \text{ 克/摩尔核苷酸对}} = 48,544 \text{ 对核苷酸}$$

如图 2-12(a) 所示, 每对核苷酸在双螺旋上升高 3.4 \AA .

$$\therefore \text{长度} = (48,544)(3.4) = 165,049 \text{ \AA} = 16.50 \text{ 微米} = 16.50 \times 10^{-4} \text{ 厘米}$$

(b) 该分子可以看成是一个长 16.50×10^{-4} 厘米, 直径为 20×10^{-8} 厘米的圆柱体.

$$\text{体积} = \pi r^2 l$$

$$\text{体积} = (3.14)(10 \times 10^{-8})^2 (16.50 \times 10^{-4}) = 5.18 \times 10^{-17} \text{ 厘米}^3$$

(c) 如图 2-12 所示, 每一螺圈有 10 对核苷酸.

$$\therefore 48,544 \text{ 对核苷酸} = 4854 \text{ 个螺圈}$$

例题 2-36

噬菌体 T4 DNA 的分子量为 1.3×10^8 (双股). (a) T4 DNA 能为多少个氨基酸编码? (b) 用 T4 DNA 能为多少个分子量为 55,000 的不同的蛋白质编码?

解:

(a) 遗传密码为一种三联体密码. 也就是说, 在 DNA 的编码股上每取三个核苷酸顺序排列, 可以规定一个氨基酸. T4 的 DNA 包含有

$$\frac{1.3 \times 10^8}{618} = 2.1 \times 10^5 \text{ 核苷酸对} = 2.1 \times 10^5 \text{ 在编码股上的核苷酸}$$

$$\frac{2.1 \times 10^5}{3} = 7 \times 10^4 \text{ 个密码子}$$

(b) 一个氨基酸残基的平均分子量是 120, 一个分子量为 55,000 的蛋白质包括

$$\frac{55,000}{120} = 458 \text{ 个氨基酸}$$

$\therefore 7 \times 10^4$ 密码子能产生

$$\frac{7 \times 10^4}{458} = 153 \text{ 个分子量为 55,000 的蛋白质}$$

(实际的数目较此数为少, 因为不是所有的 DNA 密码都能为特定的蛋白质编码.)

例题 2-37

大肠杆菌的 23S 核蛋白体的 RNA 分子量为 1.1×10^6 . 大约有总数为 0.3% 的大肠杆菌 DNA 与 23S rRNA 杂交. 大肠杆菌 DNA (染色体) 的分子量为 2.2×10^9 . 大肠杆菌染色体有多少个 23S rRNA 基因的复制品?

解:

大肠杆菌染色体大约有 0.3% (准确地说是 0.6% 的编码股) 为 23S rRNA 编码. 这部分相当于分子量的一部分:

$$(0.3 \times 10^{-2})(2.2 \times 10^9) = 6.6 \times 10^6$$

一个核苷酸残基与一个脱氧核苷酸残基的分子量大约相似 (分别为 320 与 309). 由于 DNA 与 RNA 之间的编码比率为 1:1, 所以大肠杆菌的染色体必须含有

$$\frac{6.6 \times 10^6}{1.1 \times 10^6} = 6 \text{ 个 rRNA 基因的复制品}$$

例题 2-38

能为分子量为 75,000 的蛋白质编码的 mRNA 的分子量是多少?

解:

分子量为 75,000 的蛋白质含有

$$\frac{75,000}{120} = 625 \text{ 个氨基酸}$$

为该蛋白质编码的 mRNA 含有 $(3)(625) = 1875$ 个核苷酸(考虑到“起始”区和“终止”区可能要稍多一些)。一个核苷酸残基的平均分子量约为 320, 因此, 该 mRNA 的分子量大约为

$$(1875)(320) = 600,000$$

一般来说, $MW_{\text{mRNA}}/MW_{\text{蛋白质}}$ 的比率大约为 8 到 10, 取决于氨基酸的组分。

例题 2-39

小牛胸腺 DNA 样品, 在 $0.15M \text{ NaCl} + 0.015M$ 柠檬酸钠溶液中, 其 T_m 为 86.0°C 。在同样的条件下, 已知碱基组成的 DNA 样品, 它所给出的 T_m 值如图 2-13(b)。 (a) 计算小牛胸腺 DNA 中 G+C 的含量。 (b) 对图 2-13(b) 所示条件, 推导一个简单公式表示 G+C% 含量与 T_m 的关系。

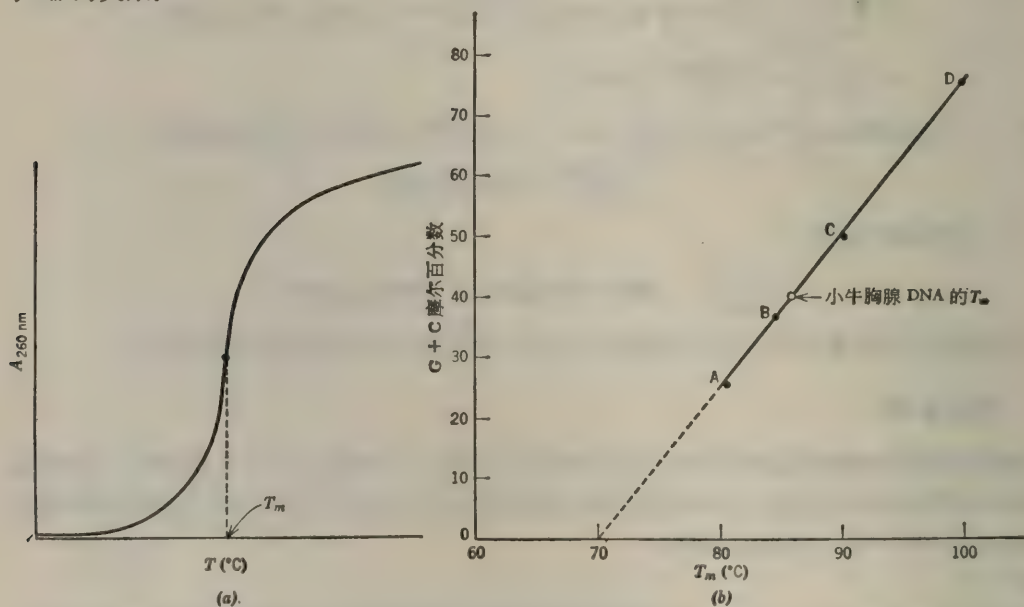


图 2-13 (a) 双股 DNA 的“溶解曲线”。(b) G+C 含量 % 与 T_m 间的直线关系。

这个直线关系仅在 G+C 含量在 25—85% 之间。

解:

当双股 DNA 溶液加热时, 可观察到紫外光吸收 ($A_{260\text{nm}}$) 增加[图 2-13(a)], 该增加是由于 DNA 的两股放松和分开的结果, 而且还伴有溶液粘度的下降。在 $A_{260\text{nm}}$ 对 T 作图所描绘

的曲线中(熔解曲线), 对应于 A_{260nm} 中点的 T 值叫做“熔解温度” (T_m)。不同来源的 DNA 样品在给定的离子介质中有不同的 T_m 值。 T_m 值随着 DNA 的 G+C 含量改变几乎呈现直线变化 [图 2-13(b)], 这是料想得到的, 因为 G 和 C 形成三个氢键, 而 A 和 T 只形成两个氢键。如图 2-12(c) 所示。

(a) 我们可以从图 2-13(b) 推测, 小牛胸腺 DNA 含有 40% 的 G+C。

(b) G+C 的 % 与 T_m 间的关系是一种直线关系。然而图 2-13(b) 所示的曲线并不是从 0°C 开始的。为了简便起见, 我们可以想象纵轴向右移, 其结果是使图形外推时过原点 (0%G+C 在 70°C)。这个曲线的方程式是 $y=mx$, 式中 $y=\%G+C$, m =斜率和 $x=T_m-70$ 。此斜率(求自标准品 A 和 C)为 $(50-25)/(90-80)=25/10=2.5$ 。

$$\therefore \%G+C=(2.5)(T_m-70) \quad (30)$$

对 T_m 为 86.0°C 来说,

$$\%G+C=2.5(86.0-70.0)=2.5(16)=40\%$$

以上方程式仅在给定的离子状态下才是正确的。

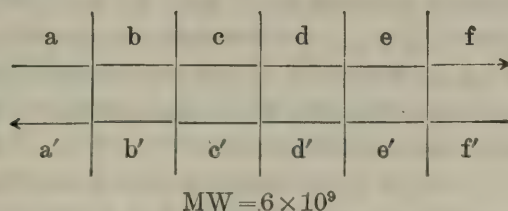
例题 2-40

从三种不同的生物体中得到的高分子量双股 DNA 样品, 经机械方法切成短小碎片, 然后熔化。溶液冷却时, 这些短碎片又重形成短的双股。测定其复性速度。B 样品在切割前分子量为 2×10^9 , 它恢复起来比 A 样品快三倍。样品 A 的最初分子量为 6×10^9 。样品 C 复性速度比样品 B 快五倍, 比样品 A 快 15 倍。所有三种溶液都含有 1 毫克 DNA/毫升。样品 C 的 DNA 的最初分子量是多少?

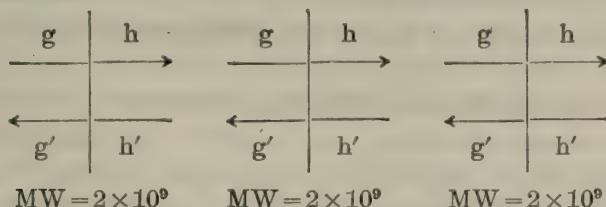
解:

样品 A 和 B 用简图表示如下, 垂直线表示切断的位置。

样品 A: 1 毫克/毫升



样品 B: 1 毫克/毫升



字母 a、b、c 等等表示多核苷酸在一股上的顺序。字母 a'、b'、c' 等等表示在另一股上互补多核苷酸的顺序。我们看到在相等的重量浓度 (毫克/毫升) 时, DNA B (而且是对所有的 DNA B 顺序都是这样) 的摩尔浓度三倍于 DNA A, 在 DNA A 溶液冷却时, 成功地复性的碰撞 12 次中只有一次, 例如: a' 小段与 a 小段形成一个短的双股, 但不与另外十一个

小段中的任何一个形成短的双股。DNA B 溶液冷却时,成功地复性的碰撞四次中只有一次(例如 g 与 g' 可以重组,而不与 h、h' 或其它的 g 重组)。因之复性的速度与最初的 DNA 分子量成反比或与互补顺序的浓度成正比。1 毫克/毫升的样品 C 复性速度比样品 B 快五倍,比样品 A 快 15 倍,所以

$$MW_C = \frac{MW_B}{5} = \frac{MW_A}{15} = \frac{2 \times 10^9}{5} = \frac{6 \times 10^9}{15} = 4 \times 10^8$$

参看第五章 A 节有关核苷酸的分光光度测定法的例题。

一般参考文献

- Barker, R., *Organic Chemistry of Biological Compounds*. Prentice-Hall(1971).
 Barry, J. M. and E. M. Barry, *An Introduction to the Structure of Biological Molecules*. Prentice-Hall(1969).
 Davidson, E. A., *Carbohydrate Chemistry*. Holt, Rinehart and Winston(1967).
 Davidson, J. N., *The Biochemistry of Nucleic Acids*. 7th ed. Academic Press(1972).
 Dickerson, R. E. and I. Geis, *The Structure and Action of Proteins*. Harper & Row(1969).
 Guthrie, R.D. and J. Honeyman. *An Introduction to the Chemistry of Carbohydrates*. 3rd ed. Clarendon Press(1968).
 Haschemeyer, R. H. and A. E. U. Haschemeyer, *Proteins*. Wiley-Interscience(1973).

练 习 题

习题答案见第 305—306 页。

氨基酸,多肽和蛋白质

1. 丙氨酸(pI=6.02), 精氨酸(pI=10.76), 谷氨酸(pI=3.22), 丝氨酸(pI=5.68)和色氨酸(pI=5.88), 在 pH3.2 时, 从 Dowex-50 柱上洗脱的次序是怎样的?
2. 在习题 1 中的五个氨基酸, 在 pH=5.68 时, 它们的相对电泳迁移率是多少?
3. 从下列资料中导出氨基酸在肽中的排列次序: (a) 组成=蛋+酪+丝+苯丙+甘+赖+丙; (b) 用 Sanger 试剂处理得到单一的 DNP 衍生物 α, ϵ -双 DNP-赖氨酸; (c) 用 CNBr 处理得到一个含有赖+蛋的二肽(即高丝氨酸)和另一个含有其余氨基酸的肽; (d) 原来的肽用羧肽酶 A 处理, 甘氨酸很快地释放出来; (e) 用糜蛋白酶处理释放出三个肽: 一个含有酪+赖+蛋, 第二个含有丙+甘, 第三个含有丝+苯丙。
4. 从下列资料中导出一个肽中氨基酸的顺序: (a) 组成=苯丙+脯+谷+2 赖; (b) 用 Edman 试剂处理生成 PTH-谷氨酸; 另外(c)用胰蛋白酶, 羧肽酶 A 和羧肽酶 B 处理都不能得到任何较小的肽或氨基酸。
5. 某肽含有等摩尔的蛋+苯丙+天冬+丝+苏, 用 CNBr 处理, 可以得到一个肽和一个单个的氨基酸(经鉴定为高丝氨酸)。原来的五肽用糜蛋白酶处理可产生两个碎片, 其中一个比另一个更显酸性; 更显酸性的那个碎片含有蛋氨酸。用羧肽酶 A 处理原来的五肽, 很快地便得到丝氨酸, 随后产生苏氨酸, 推导这个五肽的氨基酸顺序。
6. 20 个不同的 L- α -氨基酸能形成多少个不同的线型 α -连系的六肽 (a) 六个不同部位中的任一处可用任一种氨基酸, (b) 每个氨基酸在链中只能用一次? (c) 含有六个不同氨基酸的氨基酸分析图谱有多少种? (d) 氨基酸定性分析的不同图谱可能有多少种? (e) 氨基酸定量分析的不同图谱可能有多少种?
7. (a) 计算某个含有 122 个氨基酸残基的 α -螺旋的轴长。 (b) 如将此多肽链完全伸展, 此多肽链会有多长? (c) 这个蛋白质的分子量大约为多少?
8. 丝氨酸、脯氨酸、丙氨酸和甘氨酸等的残基比容分别为 0.64、0.76、0.74 和 0.64。 (a) 计算含有上述四种氨基酸、以等摩尔比例组成的合成多肽的比容和密度。 (b) 一个球形的合成多肽分子, 如果分子量为 7810, 其直径是多少?

9. 大肠杆菌的核蛋白体约为细胞体积的5%, 假如每个核蛋白体直径约为 180\AA 的球体, 计算在一个大肠杆菌细胞中核蛋白体的数目。设大肠杆菌为直径 1μ 和长 2μ 的圆柱体。

10. 计算肽平面的宽度, 即(a) α -碳与氧之间距离 x 和(b)连在氮原子上的H与 α -碳间的距离为 y , 参看图2-1。(提示: 用平面三角)

11. 谷氨酰胺合成酶为十二个相同亚基组成的十二聚体。每个亚基都能腺苷酸化。此谷氨酰胺合成酶可能有多少种定量上不同的形式?

12. 用渗透爆破(osmotic shock)方法从某种细菌中得到一种与细胞运输有关的蛋白质。对10毫克这种提纯的蛋白质进行氨基酸分析, 得到61微克的色氨酸。该蛋白质的最小分子量是多少?(色氨酸的分子量为204.1)

13. 谷胱甘肽过氧化酶重量上含有0.34%的硒(Se的原子量为78.96), 用凝胶过滤法测知此酶的分子量为88,000, 此酶可能有的四级结构是什么?

14. (a) 在 5°C 时, 某蛋白质溶液(5.0毫克/毫升)的渗透压为 2.86×10^{-3} 大气压, 估算其分子量。(b)另一次测定是在2.5毫克/毫升溶液所得的渗透压为 1.37×10^{-3} 大气压。计算分子量的更精确值。(外推到零浓度) $R=0.082\text{升} \times \text{大气压} \times \text{摩尔}^{-1} \times \text{度}^{-1}$ 。

15. 溶菌酶的 $s_{20,w}$ 为 1.91×10^{-13} 秒, D 为 11.2×10^{-7} 厘米²/秒, $\bar{v}=0.703$, 计算其分子量。

碳水化合物

16. (a)2-戊酮糖有多少个立体异构体(不包括 α, β 异构体)? (b)戊醛糖有多少个立体异构体(不包括 α, β 异构体)?

17. 2分子D-吡喃型葡萄糖可以形成多少种不同的双糖?

18. 75毫克的纤维素样品用酸水解。水解液中含有75毫克葡萄糖。此纤维素样品的纯度是多少?

19. 将一种只含有葡萄糖的双糖完全甲基化, 再用酸水解, 所发现的唯一产物为3, 4, 6-三甲基葡萄糖和2, 3, 4, 6-四甲基葡萄糖。此双糖的最可能的结构是什么?

20. (a)从棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)中分离出来某葡聚糖, 经专门作用于 $\alpha, 1-4$ 键的酶、将其完全水解为单一的双糖。此双糖用 NaBH_4 还原, 然后用高碘酸处理。每摩尔还原双糖用5摩尔高碘酸, 得到2摩尔甲酸和2摩尔甲醛。该未还原的双糖可能的结构是什么? (b)原来的多糖完全甲基化后, 继之以酸水解产生大约等摩尔数的2, 4, 6-三甲基葡萄糖和2, 3, 6-三甲基葡萄糖以及极微量的2, 3, 4, 6-四甲基葡萄糖。此多糖可能的结构是什么?

21. 32.4毫克支链淀粉完全甲基化, 随后酸水解, 产生10微摩尔的2, 3, 4, 6-四甲基葡萄糖。(a)其它产物是什么? 每一种有多少? (b)通过1—6键相连的葡萄糖残基的百分数是多少? (c)如支链淀粉的分子量为 1.2×10^6 , 则支链淀粉一分子含有多少分支点残基?

22. 棉子糖是植物中含有的一种三糖, 其结构为半乳糖($\alpha 1 \rightarrow 6$)葡萄糖($\alpha 1 \rightarrow 2\beta$)果糖(即半乳糖与蔗糖中葡萄糖残基上的第6个碳相连)。(a)一摩尔棉子糖将消耗多少摩尔的高碘酸? (b)将产生多少摩尔的甲酸? (c)棉子糖完全甲基化后再水解, 其产物是什么?

23. 直链淀粉为线型的 $\alpha, 1-4$ 葡聚糖。648毫克某直链淀粉样品用高碘酸处理, 恰好生成4.43微摩尔甲酸。(a)该样品中直链淀粉的平均分子量是多少?(b)648毫克直链淀粉需要加入多少微摩尔的 $^{14}\text{CN}^-$?

脂类

24. (a)由甘油和四个不同的脂肪酸能形成多少个不同的L-甘油三酯? (b)如果我们只计算D-L对的一种, 那么相应地能有多少不同的甘油三酯? (c)甘油和四个不同的脂肪酸能形成多少个在定量分析上不同的甘油三酯?

25. 计算丁酸甘油酯的皂化值?

26. 某乳脂样品的皂化值为230, 计算所含甘油三酯的平均分子量。

27. 某乳脂样品的碘值为 68。如果该样品的皂化值为 210, 那么一个甘油三酯分子中平均含有多少个双键?

28. 孕酮(一种女性激素)含有 80.3% 的 C, 9.5% 的 H 和 10.2% 的 O。60 毫克孕酮溶于 750 毫克苯中的溶液, 其冰点为 4.20°C 。纯苯的冰点为 5.50°C 。重摩冰点下降常数为 5.10°C 。此孕酮的实验式和分子量是多少?

29. 某脂蛋白以重量计含有 80% 蛋白质和 20% 脂肪, 计算此脂蛋白的密度和比容。蛋白质和脂类的平均密度分别为 1.30 克/厘米^3 和 0.92 克/厘米^3 。

核苷酸和核酸

30. 酵母 DNA 按摩尔计含有 32.8% 的胸腺嘧啶, 计算其它碱基的摩尔百分数。

31. 大肠杆菌 DNA(染色体)的分子量为 2.2×10^9 。(a) 此 DNA 含有多少个核苷酸对? (b) DNA 分子有多长? (c) 大肠杆菌的细胞平均体积为 $1.57 \times 10^{-12}\text{ 厘米}^3$, 此 DNA 占有细胞体积的分数是多少?

32. 大肠杆菌每 40 分钟可分裂一次, 因此, 其 DNA (分子量为 2.2×10^9) 在 40 分钟内 (或少于 40 分钟) 就可以复制出来。计算 (a) 每分钟形成核苷酸间键的数目。(b) 染色体复制的速度, 以毫米/分与微米/分表示。(假定只有一个生长点) 和 (c) 当复制时双螺旋展开(圈/分)的速度。

33. 含有 1000 个核苷酸的 mRNA 能为多大分子量的蛋白质编码?

34. 如果大肠杆菌染色体的 75% 可为特定的蛋白质编码, 那么能形成多少个平均分子量为 60,000 不同的蛋白质?

35. 能为含有 80 个核苷酸残基的 tRNA 编码的基因的分子量是多少?

36. 以下是双股 DNA 在含有 1 mM EDTA 的 10 mM 磷酸缓冲液中所得到的 T_m 数据:

样 品	%G+C	$T_m(^{\circ}\text{C})$
A	70	78.5
B	52.5	71.2
C	37.5	65.0
Z	?	73.3

(a) 计算在样品 Z 中的 %G+C。(b) 在上述情况下, 推导一个 %G+C 含量与 T_m 的关系的公式。

37. 在同样的温度、离子强度和浓度的条件下, 被切断和溶解的噬菌体 T7DNA ($\text{MW} = 1.3 \times 10^8$) 碎片, 若与被切断和溶解的噬菌体 T7DNA 以同样速度恢复 19.2%, 那么 T7DNA 的 MW 是多少?

(吕彦倬、杜汝慧译 董振芳、吴经才校)

第三章 生物化学能学

A. 能量产生和能量需要的反应

热力学定律

宇宙间的一切过程均遵守热力学基本定律。活细胞中产生的各种反应也不例外。热力学第一定律阐明,能量既不能自行产生也不能自行消灭。在任一给定的过程中,能量可以由一种形式转变成另一种形式,但系统加环境的总能量则保持恒定。热力学第一定律实际上就是能量守恒定律。它不涉及不同能量形式间的相对有用性和过程或反应进行的方向性。

热力学第二定律指出,一切自然发生的过程都是向着最小势能水平的方向进行,即趋向平衡。这种被人们称之为“自发”的反应,在趋向平衡时释放能量。从理论上说,该释放的能量可以被利用并且使之做功。“自发”反应是我们所熟悉的。例如,热从高温物体流向低温物体(决不会向相反的方向);上好弦的发条自动地松开(未上弦的发条决不会自己上紧);水向低处流(决不会自己流向高处);气体从高压或高浓度区域向低压或低浓度区域扩散(决不会向相反的方向);宏伟的金字塔有朝一日会溃散成砂砾(砂砾决不会自己集聚成金字塔)。在所有上述这些自发反应中能量总是守恒的。例如,高温物体失散的热量为低温物体所获取。但是,在自发过程中,肯定有某种东西已经丢失了。这丢失的东西即做更多功的(可转换更多能的)“本领”(capacity)或“潜力”(potential)。在自发反应发生之后,虽然系统加环境的总能量仍保持恒定,但是能量在质上的分配却和以前不同了。热力学第二定律所考虑的自发过程的单向性,以及“势”的降低可进一步做功,其较为完善的说法是:宇宙间的熵总是不断在增加。熵,通常用符号 S 表示,是衡量系统中能量和物质的无规性或有秩性的一个物理量。系统愈是无规则、无秩序、无组织或混乱,它的熵就愈大。反之,系统愈是有组织、有秩序、有约束或有结构,它的熵就愈小。只有有组织的而不是无规则的能量才是有用的(可使之做功)。熵的增加表示系统失去了组织性,从而降低了可以进一步做功的“势”。第二定律直接导致热力学第三定律:在温度为绝对零度($^{\circ}\text{K}$)时,无规则运动全部停止,每种物质的理想晶体(perfect crystal)的熵为零,即,所有原子都处于最有秩序的状态。

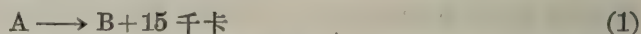
假如自发方向是组织性的降低,那么,我们又怎能解释复杂的、有高度组织性的大分子物质的生物合成,以及活细胞的真实存在呢?这种现象并不违背热力学定律,正象用砂砾筑造金字塔不违背热力学定律一样。在一个给定的系统中,物质和能量组织性降低的自然倾向可因对该系统加入能量,即,对该系统做功而逆转。这时,总能量——受能系统加供能系统——保持恒定,总熵——受能系统加环境——增加了。然而,该受能系统的熵却可以增加、减少或不变。一般说,活细胞从其周围环境摄入高熵状态的原料,靠消耗环境使这些原料转化成低熵状态的物质,在转化过程中环境也提供了实现这一转化所需要的低熵状态的化学能量。具有光合作用能力的生物则可以从环境中取得光能。

尽管生物学家对反应进行中发生的熵的变化十分感兴趣,但是反应中还有两个与反应有关的,如众所周知的热力学状态函数,它们比熵的变化较易于测定或计算。这两个状态函

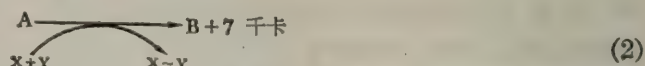
数就是(a)自由能的变化和(b)焓或称热含量的变化。自由能的变化可用来衡量在恒温、恒压下,某反应所能做的最大有用功,其数值决定于系统偏离平衡状态的程度。焓的变化是用以衡量在恒温、恒压和恒容下,某反应走向平衡时所伴随的热量的流动。这些概念我们还要在下面做比较详细的研究。

偶联反应

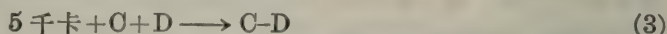
化学反应可分做(a)放能反应和(b)吸能反应两大类。放能反应是指那些产生能量的反应(这些反应进行时可以做功)。吸能反应则指那些利用(需要)能量的反应(必须对它做功才能进行反应)。为什么有些反应要比另外一些反应放出更多的能量,虽然不能一眼看出,但是凭着直觉同学们认识到,生物合成过程(即由组分亚基构成大分子的过程)是需要能量的。从简单的建筑材料建成复杂的构造必须对它做功。活细胞是极其复杂和精密的。它不仅要在长时期内维持细胞的完整性,而且还要生长和繁殖。按照能学的词句来说,完成这项任务就需要有某些催化放能的反应参与,以及从“高能”化合物中捕获释放出的部分能量。生物合成(吸能)反应就是靠捕获的这种能量推动的。举例来说,假定A变成B是放能反应,放出15千卡的能量:



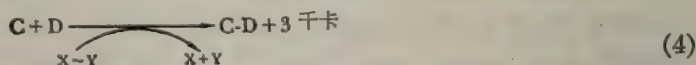
如果反应按上式进行,全部能量就白白地浪费了。在活细胞中,反应(1)可以同合成高能化合物X~Y的吸能反应相偶联,捕获了一部分能量。如果合成X~Y需要能量8千卡,那么,总的偶联反应放出的能量只有7千卡。



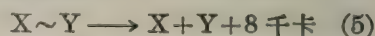
现在假设有一复杂分子C-D将由其组分C+D合成。这个反应是吸能的,只要供给5千卡的能量就能使反应进行。



“高能”化合物X~Y是能够供给这5千卡能量的。因为X~Y贮有8千卡能量,而上述合成反应只需要5千卡,因此总的偶联反应就只有3千卡能量放出了。



很明显,如果X~Y在解裂成其组分时不与这吸能反应相偶联,那么,这8千卡的能量就会浪费掉。



这些能量间的相互关系可以用图3-1说明。注意,没有一个反应具有100%的效率。在最初可被利用的15千卡能量中,只有8千卡为X~Y保留;在X~Y所保留的8千卡能量中,又只有5千卡为C-D捕获。

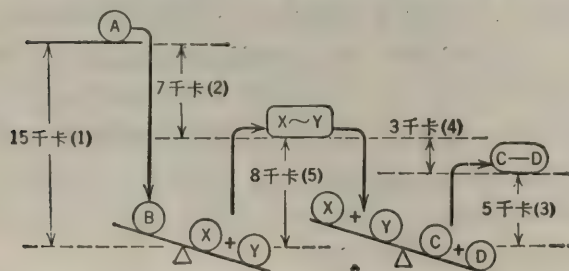
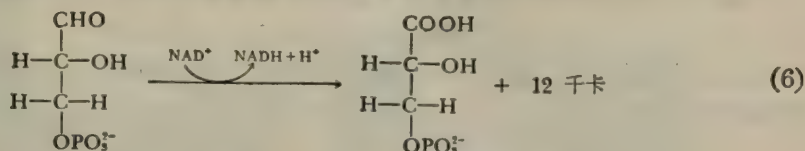


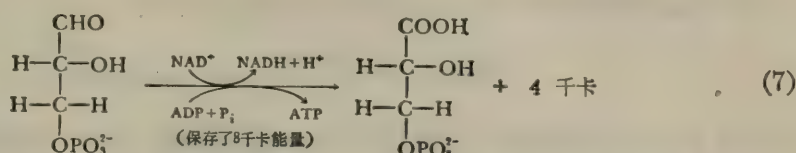
图3-1 A变成B时放出能量使C+D合成C-D。合成过程中能量间的相互关系。

偶联反应的概念充分地说明了活

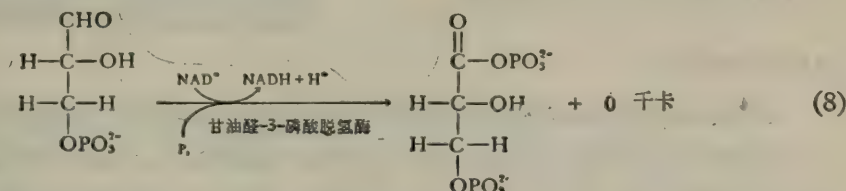
细胞中能量守恒和能量利用的原理。但是，在活细胞中能量间偶联的实际机制很少是两个反应的共同催化作用，而往往是通过有着共同中间物的两个连续反应以达到最终效果。我们可举 3-磷酸甘油醛氧化成 3-磷酸甘油酸做为生成高能化合物的例子。



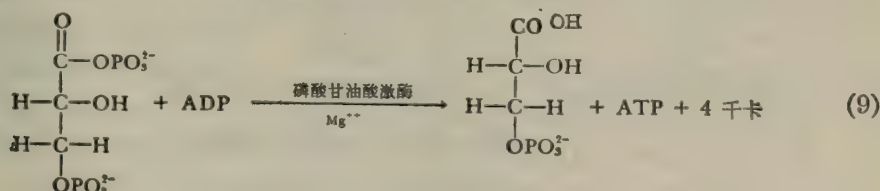
这个氧化还原反应产生的能量，在如下假想的偶联反应中，是足够推动由 ADP 和 P_i 合成 ATP 的。



但是在活细胞中实际的偶联机制并不是(7)式所表示的那样，而是在氧化反应进行的同时先有高能酰基磷酸生成。

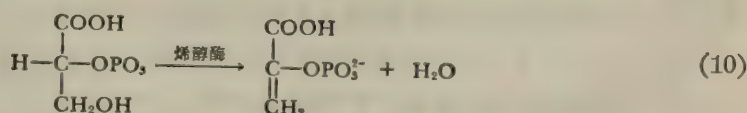


然后，高能酰基磷酸再转移磷酸基给 ADP，将能量保存起来。



反应(8)加反应(9)同偶联反应(7)等效。

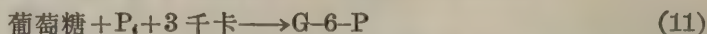
由 2-磷酸甘油酸(2-PGA)形成磷酸烯醇丙酮酸(PEP)说明了生成高能化合物的另一个原理。



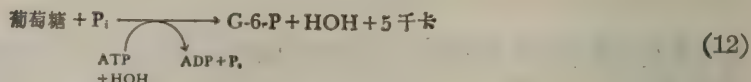
在这个反应中，高能化合物是由低能量的前体通过简单的脱水反应产生的。同学们不免要问：“能量是从哪里来的呢？”。这需要从生物化学家给“高能”所下的定义中找答案。尽管事实上 2-PGA 被相对地认为是“低能”物质，但是若将它同 PEP 相比，二者在燃烧成 CO_2 、 H_2O 和 P_i 时，产生的能量几乎相同。脱水反应引起了分子内部的电子重排，因而在水解时

使总势能的大部分变为有用。生物化学家所定义的“高能”化合物,指的是水解时有较多能量放出的物质(在标准状态下每摩尔放出能量 7 到 18 千卡)(我们也可将烯醇酶催化的反应看做是分子内部的氧化还原反应:与 OH 相连的 O 被还原,与磷酸相连的 O 被氧化)。

我们再举葡萄糖和无机磷酸合成葡糖-6-磷酸做为利用高能化合物的例子。



这个反应是吸能反应,需要 3 千卡/摩尔的能量。这能量可由 ATP 水解供应。假设它们之间的偶联反应为



但是实际由己糖激酶催化的反应乃是两个个别反应之和。



在反应中,ATP 不仅供应了能量,而且也供应了磷酸基。事实上,活细胞中的高能化合物很少通过水解释放能量,而是该势能用作“基团转移势”——这种势能用来转移高能分子的一部分给受体,实际上是“活化”受体。在胞细中,ATP 可用做(a)磷酸供体,(b)焦磷酸供体,(c)AMP 供体,以及(d)腺苷供体。

自由能变化(ΔG)

化学反应中能量的释放或利用体现了产物和反应物间能量含量的差异。在恒温、恒压下,这种能量差异叫做“自由能差”(或“Gibbs 自由能变化”),用 ΔG 表示,它乃是某反应可做有用功的最大势。根据定义, ΔG 为产物的自由能减去反应物的自由能。因之,对于放能反应(1),可以写成



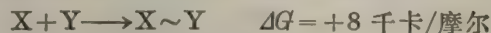
为了使 A 等于 B 加能量, A 的自由能必大于 B 的自由能。

$$\Delta G = (\text{某值}) - (\text{某更大的值})$$

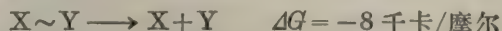
$$\Delta G = \text{负值}$$

$$\Delta G = -15 \text{ 千卡}$$

因此,根据 ΔG 的定义,放能反应的 ΔG 为负值,吸能反应的 ΔG 为正值。如果反应式逆转来写, ΔG 的正、负号也要跟着改变。例如,合成 $\text{X} \sim \text{Y}$ 时,每合成 1 摩尔需要能量 8 千卡,所以这个合成(吸能)反应的 ΔG 是 +8 千卡/摩尔。



$\text{X} \sim \text{Y}$ 解裂时,放出能量 8 千卡/摩尔,因此



ΔG 和 $[\text{P}]/[\text{S}]$ 比值的关係

设某反应为 $\text{S} \longrightarrow \text{P}$, S 是反应物或“底物”(酶作用的), P 是产物。能量释放的多少与

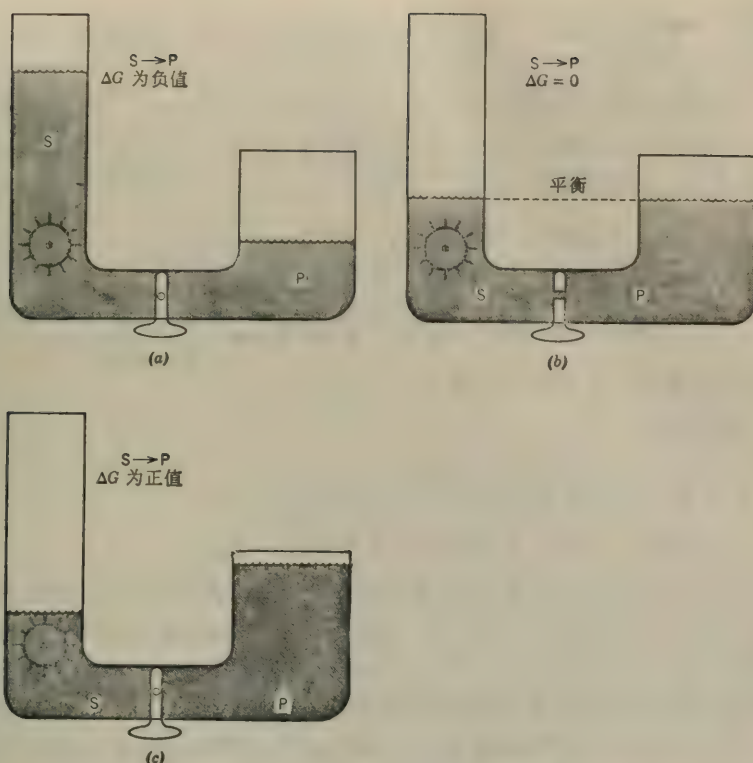


图 3-2 (a) 反应开始时, $[S]/[P]$ 比值大于平衡时的比值, 当打开活塞时, S 将“自发地”变成 P; (b) 反应终了时, $[S]/[P]$ 比值等于平衡时的比值, $[P]/[S] = K_{\text{平}}$, 反应不再进行; (c) $[P]/[S]$ 比值大于平衡时的比值。打开活塞时, 反应的“自发”方向是 P 变成 S。

S 和 P 的浓度间有什么关系呢? 我们用类推法, 假设 S 和 P 的浓度可分别用分隔在 U 形管两臂的液体体积来表示, 如图 3-2 所示。我们还在含有 S 的侧臂中放入一个水轮。当打开隔离着 S 和 P 的活塞 (即加入催化 $S \rightarrow P$ 的酶), S 就转变成 P。在 S 液面下降时, 水轮转动了 (即反应进行时释放出能量并做了功)。S 继续向 P 转变, 直到达到平衡为止。就上述的特殊反应而言, 在平衡时, S 和 P 的体积是不一样的, 它表明平衡有利于 P 的生成。从这一类推中我们可以看到, 能量释放的多少取决于原始 S/P 比值偏离平衡状态的程度。S/P 的比值愈大, 在 S 转变成 P 的过程中做的功就愈多。我们还可以看到, 如果原始 S/P 比值与平衡时的 S/P 比值相同 (平衡时的 P/S 比值等于 $K_{\text{平}}$), 就不会有 S 向 P 的转变, 也就不能做功 ($\Delta G = 0$)。如果开始时 P/S 比值大于 $K_{\text{平}}$ (即体系中的 P 比平衡时的 P 多), 那么, 必须对系统做功 (需要能量) 才能使 S 转变成更多的 P (ΔG 为正值)。但此时 P 向 S 的转变与放出能量同时出现 (即 ΔG 为负值), 直至达到平衡状态 (系统处于最低能量水平) 为止。

U 形管类推法并不是完美无缺的, 因为在活细胞中发生的绝大多数反应从未达到平衡。实际上, 活细胞中的反应物和产物是维持在 (窄小范围内) 稳态水平, 这个稳态可完全不同于平衡状态。但是, 类推法说明了反应中能量的释放和利用是怎样取决于系统偏离平衡状态程度的。某反应的 ΔG , 若用数学式陈述, 势必包括两项。一项用以表明底物和产物的实际浓度, 另一项则表明平衡时的浓度。将数学表示式用于反应 $cS_1 + dS_2 + \dots \rightarrow aP_1 + bP_2 + \dots$ 可以得到:

$$\Delta G = RT \ln \frac{[P_1]^a [P_2]^b \dots}{[S_1]^c [S_2]^d \dots} - RT \ln K_{\text{平}}$$

即, ΔG ...取决于 $\underbrace{\frac{[P_1]^a [P_2]^b \dots}{[S_1]^c [S_2]^d \dots}}_{\left\{ \begin{smallmatrix} \text{产物/底物的} \\ \text{实际浓度比} \end{smallmatrix} \right\}}$ 同 $\underbrace{RT \ln K_{\text{平}}}_{\left\{ \begin{smallmatrix} \text{产物/底物的} \\ \text{平衡浓度比} \end{smallmatrix} \right\}}$ 之差

或

$$\Delta G = -RT \ln K_{\text{平}} + RT \ln \frac{[P_1]^a [P_2]^b \dots}{[S_1]^c [S_2]^d \dots} \quad (14)$$

或

$$\Delta G = -2.3RT \log K_{\text{平}} + 2.3RT \log \frac{[P_1]^a [P_2]^b \dots}{[S_1]^c [S_2]^d \dots} \quad (15)$$

式中, R = 气体常数 = $1.987 \text{ 卡} \times \text{摩尔}^{-1} \times ^\circ\text{K}^{-1}$,

T = 绝对温度, $^\circ\text{K}$,

$[P]$ 、 $[S]$ 等 = 产物和底物的实际浓度,

a, b, c 等 = 化学平衡式中 P, S 等项的系数.

在 25°C 时, $2.303RT = 1364$; 在 37°C 时, $2.303RT = 1419$.

我们可从(14)或(15)式中看出, 平衡时的 $[P]/[S]$ 比值等于 $K_{\text{平}}$, 因此 $\Delta G = 0$.

为了编目和比较不同反应的 ΔG 值, 化学家们一致同意将所有的反应物和产物维持在 $1M$ 的稳态浓度定为“标准状态”. 气体的标准状态是指分压为 1 大气压的状态. 在标准状态下, $\log [P]/[S]$ 一项(不管幂为何值)等于零. 标准状态下的 ΔG 用 ΔG° 表示之.

$$\Delta G = -1364 \log K_{\text{平}} + 1364 \log 1 = -1364 \log K_{\text{平}} + 0$$

$$\Delta G^\circ = -1364 \log K_{\text{平}} \quad \text{在 } 25^\circ\text{C} \text{ 时} \quad (16)$$

因此, 一个反应的 ΔG° 值与 $K_{\text{平}}$ 有关. 事实上, ΔG° 和 $K_{\text{平}}$ 二者传递的是同一的信息, 即, 当各种底物和产物的浓度都是 $1M$ 时, 反应将向哪个方向变化, 以及变化至何种程度. ΔG° 和 $K_{\text{平}}$ 数值间的对应关系见表 3-1.

表 3-1 25°C 时 $K_{\text{平}}$ 与 ΔG° 数值间的对应关系

$K_{\text{平}}$	$\log K_{\text{平}}$	ΔG°
0.0001	-4	+5456 卡
0.001	-3	+4092 卡
0.01	-2	+2728 卡
0.1	-1	+1364 卡
1	0	0
10	1	-1364 卡
100	2	-2728 卡
1000	3	-4092 卡
10,000	4	-5456 卡

在任意给定的一组浓度条件下, ΔG 的实际值可用下式计算.

$$\Delta G = -1364 \log K_{\text{平}} + 1364 \log \frac{[P_1]^a [P_2]^b \dots}{[S_1]^c [S_2]^d \dots} \quad (17)$$

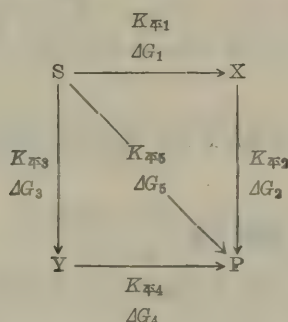
或

$$\Delta G = \Delta G^\circ + 1364 \log \frac{[P_1]^a [P_2]^b \dots}{[S_1]^c [S_2]^d \dots} \quad \text{在 } 25^\circ\text{C} \text{ 时} \quad (18)$$

ΔG 为负值意味着反应按照书写的方式自左向右进行时, 能量趋向最低状态. 这样的反

应叫做“自发”反应。自发反应就是某个反应如果真要进行就一定按照书写的反应式由左向右进行。 ΔG 负值的大小甚至可以告诉我们反应向右进行的程度(因为 ΔG 的大小是表示系统偏离平衡状态程度的)。然而 ΔG 的数值丝毫不能说明反应走向平衡时的速度。许多具有很负 ΔG 值的反应,在缺乏适当催化剂(酶)时,并没有可觉察的反应速度(在体温条件下)。这种情况同图 3-2(a)所示的情况相似。系统可以偏离平衡状态很远,但是不打开活塞,就没有反应发生。

某反应的 ΔG 只告诉我们产物自由能和原始底物自由能之间的差值。该差值总是同一数值,不管反应所取途径或所包含的步骤数目是多少。例如,设 S 通向 P 有三条可行的反应程序,如下:

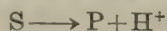


不论反应程序是 $S \longrightarrow P$, $S \longrightarrow X \longrightarrow P$ 或 $S \longrightarrow Y \longrightarrow P$, 总的 ΔG 都一样。既然总的 ΔG 相同,那么就有 $\Delta G_1 + \Delta G_2 = \Delta G_3 + \Delta G_4 = \Delta G_5$ 。同样,总的平衡常数也是一样:

$$K_{平1} \times K_{平2} = K_{平3} \times K_{平4} = K_{平5}$$

非标准 $[H^+]$ 的影响

当 H^+ 离子作为底物或产物出现时,其标准状态浓度也取作 $1M$ (即, $pH=0$)。但是,几乎所有的酶在 $pH=0$ 时都变性,因此,就没有反应可供研究了。正因为此,生物化学家选用了一种修正的标准状态:即除 H^+ 外,其他底物或产物的浓度都规定为 $1M$ 。 H^+ 离子浓度则取生理学上的某一数值(例如 $10^{-7}M$)。修正的标准状态下的自由能变化用 $\Delta G'$ 表示, $\Delta G'$ 与 ΔG° 间的关系很易计算。例如,某反应产物中有 H^+ 离子出现。



$$\Delta G = \Delta G^\circ + 1364 \log \frac{[P][H^+]}{[S]}$$

$$\Delta G' = \Delta G^\circ + 1364 \log [H^+] \quad \text{当 } [S] \text{ 和 } [P] = 1M \text{ 时}$$

$$= \Delta G^\circ - 1364 \log \frac{1}{[H^+]}$$

$$\Delta G' = \Delta G^\circ - 1364 pH \quad \text{在 } 25^\circ C \text{ 时} \quad (19)$$

对于含有 H^+ 离子作为底物的反应,该关系为

$$\Delta G' = \Delta G^\circ + 1364 pH \quad \text{在 } 25^\circ C \text{ 时} \quad (20)$$

(19)或(20)式假定,反应的结果基团的电离没有变化。这就是说,反应中不含有可电离的化合物,或者,倘若确实含有可电离的基团,那么,它在底物和产物中应具有相同的 pK_a 值。

(H^+ 在产物中出现有可能来自 $-CHOH-$ 基氧化成 $>C=O$ 基的反应)。(19)式可用来推

测某非零 pH 值下的 $\Delta G'$ 。如果将 1M 完全电离的产物取做标准状态, (19) 式也可用于产物电离的情况。这如同将反应式写成 $S \rightarrow P + H^+$ 一样, 只不过是 P 相当于 A^- 。我们以后将会看到, 生物化学家喜欢取 1M 的总产物 (电离的 P 加未电离的 P) 做标准状态。在这种情况下, $\Delta G'$ 和 ΔG° 之间的关系就需要用另外一个方程式来表示了 (推导见后)。

某反应在生理标准状态下 (即除 H^+ 外各种底物和产物都是 1M) 的 $\Delta G'$ 可表示为

$$\Delta G' = -2.3RT \log K'_{\mp} \quad (21)$$

或

$$\Delta G' = -1364 \log K'_{\mp} \quad \text{在 } 25^\circ\text{C 时} \quad (22)$$

式中的 K'_{\mp} 是反应在指定 pH 值下的平衡常数 (一般为 7 左右)。当底物和产物的浓度不是 1M (但 pH=7), 某反应的 ΔG 为

$$\Delta G = -2.3RT \log K'_{\mp} + 2.3RT \log \frac{[P_1]^a [P_2]^b \dots}{[S_1]^c [S_2]^d \dots}$$

或

$$\Delta G = \Delta G' + 2.3RT \log \frac{[P_1]^a [P_2]^b \dots}{[S_1]^c [S_2]^d \dots} \quad (23)$$

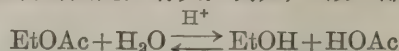
或

$$\Delta G = \Delta G' + 1364 \log \frac{[P_1]^a [P_2]^b \dots}{[S_1]^c [S_2]^d \dots} \quad \text{在 } 25^\circ\text{C 时} \quad (24)$$

因此, 如果 K'_{\mp} 或 $\Delta G'$ 已经指明, 在计算中就不再需要包括有 H^+ 或 pH 了, 除非我们对计算另一个 pH 值下的 $\Delta G'$ 感兴趣。

“ K_{\mp} ” 和 “ ΔG ” 的不同习惯定义法

我们希望某反应的 “ K_{\mp} ” 在一组给定的实验条件下 (如温度、压力、总离子强度) 为一固定值。然而 “ K_{\mp} ” 的数值与如何对其定义有关。例如, 乙酸乙酯的酸催化水解反应可写为



我们可定义 K_{\mp} 如下:

$$K_{\mp 1} = \frac{[\text{EtOH}][\text{HOAc}]}{[\text{EtOAc}][\text{H}_2\text{O}]} \quad (\text{习惯表示法 I})$$

假定我们测定了平衡时各组分的浓度, 而且得到 $[\text{EtOH}] = 2 \times 10^{-1} M$, $[\text{HOAc}] = 2 \times 10^{-1} M$, $[\text{EtOAc}] = 2.18 \times 10^{-3} M$ 。由于所定义的 $K_{\mp 1}$ 中含有 $[\text{H}_2\text{O}]$, 而水的浓度非常接近于 (1000 克/升)/(18 克/摩尔) = 55.6M。

$$\therefore K_{\mp 1} = \frac{(0.2)(0.2)}{(2.18 \times 10^{-3})(55.6)} = 0.33$$

和

$$\Delta G_1^\circ = -1364 \log 0.33 = +656.7 \text{ 卡/摩尔}$$

计算出来的 $K_{\mp 1}$ 和 ΔG_1° 对如上所定义的反应是正确的。 ΔG_1° 为正值说明, 当所有组分的浓度 (包括水) 均为 1M 时, 反应将向左进行。由于水在稀溶液中的浓度基本上是常数, 我们也可以将 “ K_{\mp} ” 定义为

$$K_{\mp 2} = \frac{[\text{EtOH}][\text{HOAc}]}{[\text{EtOAc}]} = K_{\mp 1} [\text{H}_2\text{O}] \quad (\text{习惯表示法 II})$$

$$K_{\mp 2} = (0.33)(55.6) = 18.35 M$$

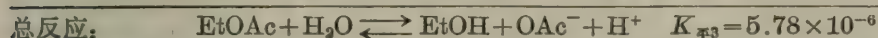
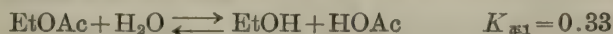
和

$$\Delta G_2^\circ = -1364 \log 18.35 = -1724 \text{ 卡/摩尔}$$

ΔG_2° 为负值说明, 除水外 (水的浓度为 55.6M), 其他所有组分的浓度为 1M 时, 此反应向右进行。 $K_{\mp 1}$ 和 $K_{\mp 2}$ 虽然有不同数值, 但二者说的是同一件事。举例来说, 如果平衡时 EtOAc

的浓度为已知,我们可以利用 $K_{\mp 1}$ 计算平衡时 EtOH 和 HOAc 浓度. 使用 $K_{\mp 1}$ 计算时,必须包括有 $[\text{H}_2\text{O}] = 55.6M$. 如用 $K_{\mp 2}$ 来计算,我们可以得到完全相同的答案. 但是在计算时,不包括有水的浓度(因为水的浓度已并入到 $K_{\mp 2}$ 中去了).

假设该水解反应是在某固定 pH 值下用酶(称做酯酶)催化进行的,而在此 pH 值下 HOAc 电离,所发生的反应可以写成



$$\therefore K_{\mp 3} = \frac{[\text{EtOH}][\text{OAc}^-][\text{H}^+]}{[\text{EtOAc}][\text{H}_2\text{O}]} = (K_{\mp 1})(K_a) \quad (\text{习惯表示法 III})$$

$$K_{\mp 3} = 5.78 \times 10^{-6}$$

或 $K_{\mp 4} = \frac{[\text{EtOH}][\text{OAc}^-][\text{H}^+]}{[\text{EtOAc}]} = [\text{H}_2\text{O}](K_{\mp 1})(K_a) \quad (\text{习惯表示法 IV})$

$$K_{\mp 4} = 3.21 \times 10^{-4}$$

和 $\Delta G_3^\circ = -1364 \log 5.78 \times 10^{-6} = +7145 \text{ 卡/摩尔}$

$$\Delta G_4^\circ = -1364 \log 3.21 \times 10^{-4} = +4765 \text{ 卡/摩尔}$$

由于“ K_{\mp} ”定义的方法不同,所以 $K_{\mp 4}$ 不同于 $K_{\mp 3}$ (ΔG_4° 也不同于 ΔG_3°). 但是,无论使用哪个关系式来推测某一组分的浓度(其他组分浓度为已知),都会得到同样正确的答案. 注意,在 $K_{\mp 3}$ 和 $K_{\mp 4}$ 的关系式中,乙酸浓度用 OAc^- 而不是用 HOAc 或 HOAc 加 OAc^- (“乙酸”的总分析浓度)表示的. ΔG_4° 为正值说明,当所有组分的浓度(包括 $[\text{H}^+]$) 为 $1M$ 时(但 $[\text{H}_2\text{O}] = 55.6M$),反应将向左进行.

到目前为止,我们已看到常数 $[\text{H}_2\text{O}]$ 可以并到“ K_{\mp} ”和“ ΔG° ”的数值中去. 在某一固定的 pH 值下, $[\text{H}^+]$ 也是常数,也同样可以并到有关的常数中去,而得到在某固定 pH 值下的“ K_{\mp} ”和“ ΔG° ”. 这个新的, $\text{pH} \neq 0$ 的标准 $\Delta G'$ 和 K_{\mp} 分别用 $\Delta G'$ 和 K'_{\mp} 来表示. 例如,在 pH7.0 时:

$$K'_{\mp 4} = \frac{[\text{EtOH}][\text{OAc}^-]}{[\text{EtOAc}]} = \frac{K_{\mp 4}}{[\text{H}^+]} \quad (\text{习惯表示法 V})$$

$$K'_{\mp 4} = \frac{3.21 \times 10^{-4}}{10^{-7}} = 3.21 \times 10^3$$

$$\Delta G'_4 = -1364 \log 3.21 \times 10^3 = -4783 \text{ 卡/摩尔} \quad (\text{在 pH7.0 时})$$

同前面一样,如果在 pH7 时平衡的 $[\text{EtOH}]$ 和 $[\text{EtOAc}]$ 为已知,那么,平衡的 $[\text{OAc}^-]$ 就可以用 $K'_{\mp 4}$ 计算. 使用 $K_{\mp 4}$ 计算 $[\text{OAc}^-]$,也可以得到同样的结果,只不过在计算时包括有 $[\text{H}^+]$. $\Delta G'_4$ 为负值说明,在 $1M \text{EtOH}$, $1M \text{OAc}^-$ 和 $1M \text{EtOAc}$ 时(水为 $55.6M$, H^+ 为 $10^{-7}M$),反应将向右进行.

$\Delta G'_4$ 和 ΔG_4° 之间的关系,我们在前面已经见过.

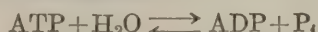
$$\Delta G'_4 = -1364 \log \frac{[\text{EtOH}][\text{OAc}^-]}{[\text{EtOAc}]} + 1364 \log [\text{H}^+]$$

$$\Delta G'_4 = \Delta G_4^\circ - 1364 \text{ pH} \quad (25)$$

再说一遍:上面所计算的 $\Delta G'$,有些是正值,有些是负值,并不矛盾. 每一个标准 ΔG 各代表一种不同的状态. 例如, $1M \text{H}_2\text{O} (\Delta G_1^\circ)$, $55.6M \text{H}_2\text{O} (\Delta G_2^\circ)$, $1M \text{H}_2\text{O}$ 和 $1M \text{H}^+ (\Delta G_3^\circ)$,

55.6M H₂O 和 1M H⁺ ($\Delta G'_4$), 55.6M H₂O 和 10⁻⁷M H⁺ ($\Delta G'_4$). 如果将所计算的各个标准 ΔG 的符号和数值大小做一比较, 我们就会看到, 当 [H₂O] 增加和 [H⁺] 降低时, 标准 ΔG 变得更负. 这正是我们所料到的: [H₂O] 高, 促进水解; [H⁺] 低 (pH 高) 促进 HOAc 电离, 将水解反应拉向右方.

乍一看, 似乎觉得生物化学家会对 $K'_{\mp 4}$ 和 $\Delta G'_4$ 感兴趣. 但是这些常数是用 OAc⁻ 浓度定义的. 生物化学家研究 pH7 时酯酶所催化的水解反应大概会发现: 测定产物乙酸的总 (分析的) 浓度 (OAc⁻ 加 HOAc) 更为便利. 实际上许多有生物学意义的化合物具有多种电离基团, 在任一给定的 pH 值下能生成若干种电离形式. 另外, 两种或两种以上的底物或产物也有可能以多种电离的形式存在. 这样, 用每个化合物的某一电离形式来定义 K_{\mp} 或 $\Delta G'$ 将会不切实用. 举例来说, ATP 的水解反应为



在 pH 6 到 7.5 左右, 无机磷酸 ($pK_a = 6.82$) 是以 HO-PO₃H⁻ 和 HO-PO₃²⁻ 的混合物形式存在的. 与之相似, ATP ($pK_a = 6.95$) 和 ADP ($pK_a = 6.68$) 的末端磷酸也是以负一价和负二价离子的混合物形式存在. 使用总 [ATP], [ADP] 和 [P_i] 来定义 K_{\mp} 就会简单多了. 为了解总分析浓度是如何并入到 K'_{\mp} 和 $\Delta G'$ 表达式中去的, 让我们再回到酯酶所催化的水解反应上来. 我们想要测定 K'_{\mp} 的数值, 而

$$K'_{\mp} = \frac{[\text{EtOH}][\text{HOAc} + \text{OAc}]}{[\text{EtOAc}]} = \frac{[\text{EtOH}][\text{OAc}]_{\Sigma}}{[\text{EtOAc}]} \quad (\text{习惯表示法 VI})$$

式中, $[\text{OAc}]_{\Sigma}$ = 总乙酸浓度 = $[\text{HOAc}] + [\text{OAc}^-]$.

我们知道:

$$\frac{[\text{OAc}^-][\text{H}^+]}{[\text{HOAc}]} = K_a \quad \text{或} \quad \frac{[\text{HOAc}]}{[\text{OAc}^-]} = \frac{[\text{H}^+]}{K_a}$$

$$[\text{OAc}^-] = [\text{OAc}]_{\Sigma} - [\text{HOAc}]$$

$$\therefore \frac{[\text{HOAc}]}{[\text{OAc}]_{\Sigma} - [\text{HOAc}]} = \frac{[\text{H}^+]}{K_a}, \quad K_a[\text{HOAc}] = [\text{H}^+][\text{OAc}]_{\Sigma} - [\text{H}^+][\text{HOAc}]$$

$$K_a[\text{HOAc}] + [\text{H}^+][\text{HOAc}] = [\text{H}^+][\text{OAc}]_{\Sigma}, \quad [\text{HOAc}]([\text{H}^+] + K_a) = [\text{H}^+][\text{OAc}]_{\Sigma}$$

$$[\text{OAc}]_{\Sigma} = \frac{[\text{HOAc}]([\text{H}^+] + K_a)}{[\text{H}^+]} = [\text{HOAc}] \left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]} \right)$$

将 $[\text{OAc}]_{\Sigma}$ 代入 K'_{\mp} 表达式中,

$$K'_{\mp} = \frac{[\text{EtOH}][\text{OAc}]_{\Sigma}}{[\text{EtOAc}]} = \frac{[\text{EtOH}][\text{HOAc}]}{[\text{EtOAc}]} \left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]} \right)$$

$$\therefore K'_{\mp} = K_{\mp 2} \left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]} \right)$$

在 pH7.0 时:

$$K'_{\mp} = (18.35) \left(1 + \frac{1.75 \times 10^{-5}}{10^{-7}} \right) = (18.35) (176)$$

$$K'_{\mp} = 3.23 \times 10^3$$

$$\Delta G' = -1364 \log 3.23 \times 10^3 = -4787 \text{ 卡/摩尔}$$

K'_{\mp} 和 $\Delta G'$ 的数值与 $K'_{\mp 4}$ 和 $\Delta G'_4$ 很接近. 这个结果也正是我们所料到的, 因为在 pH7.0 时, $[\text{OAc}^-] \simeq [\text{OAc}]_{\Sigma}$. 在低 pH 值时, 所有的乙酸已不再是以几乎唯一的一种电离形式存在, 用这两种不同的习惯表示法计算, 就会得到明显不同的数值.

让我们再返回来考查一下电离作用对标准状态 ΔG 的影响. 在 pH0 (即 1M H⁺) 时, 标

准状态的 ΔG 用 ΔG° 表示, 为简便计将它记作 ΔG° (从现在起水的活度将设为 1——就是说所有的平衡常数中都包括有 $55.6M\text{H}_2\text{O}$ 在内). 在 $\text{pH}7.0$ 时 (即 H^+ 为 $10^{-7}M$), 标准状态的 ΔG 用 $\Delta G'$ 表示. 于是有

$$\Delta G^\circ = -1364 \log K_{\mp 2}$$

$$\Delta G' = -1364 \log K_{\mp 2} \left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]} \right)$$

这两种不同状态下的标准 ΔG 之差为

$$\begin{aligned} \Delta G' - \Delta G^\circ &= -1364 \log K_{\mp 2} \left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]} \right) + 1364 \log K_{\mp 2} \\ &= -1364 \log K_{\mp 2} - 1364 \log \left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]} \right) + 1364 \log K_{\mp 2} \\ &= -1364 \log \left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]} \right) \end{aligned}$$

或

$$\Delta G' = \Delta G^\circ - 1364 \log \left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]} \right) \quad (26)$$

或

$$\Delta G' = \Delta G^\circ + \Delta G_{\#} \quad (27)$$

在此

$$\Delta G_{\#} = -1364 \log \left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]} \right) \quad (28)$$

$\Delta G_{\#}$ 是原始浓度为 $1M$ 的某化合物因电离而引起的每摩尔自由能的变化 (电离后, 此化合物的总浓度, $\text{HOAc} + \text{OAc}^-$, 仍为 $1M$). 这里似乎是有了矛盾. 前面我们看到, 对于产物中出现有 H^+ 的反应, 其 $\Delta G'$ 用式 (19) 或 (25) 表示. 这两个式子同上面导出的式 (26) 不一样. 之所以出现了两种表达式间的差异, 是因为选用了不同的标准状态. 式 (19) 或 (25) 只对所有反应物 (除了 H_2O 和 H^+) 是 $1M$ 的标准状态适用, 其中包括了 $[\text{OAc}^-] = 1M$. 式 (28) 并未假设 $[\text{OAc}^-] = 1M$, 但它要求总 $[\text{HOAc}] + [\text{OAc}^-]$ 为 $1M$. 因为生物化学家打交道的浓度都是总 (分析的) 浓度, 所以当有可电离的基团存在时, 用式 (28) 来推测 pH 变化对标准状态 ΔG 的影响. 应当再强调一次, 如果在某固定 pH 值下的 K'_a 或 $\Delta G'$ 为已知, 而且组分浓度是用包括有各种电离形式的总浓度表示的, 那么, 在计算中就不需要包括有 H^+ 或 H_2O 了. 对于非标准状态下 (总 $[\text{S}] \neq 1M$, 总 $[\text{P}] \neq 1M$) ΔG 的计算则可以直接使用式 (23) 或 (24).

例题 3-1

乙酸的解离方程式为 $\text{HOAc} \rightleftharpoons \text{OAc}^- + \text{H}^+$, $K_a = 1.75 \times 10^{-5}$, 计算 (a) $\text{pH} = 0$ 和 (b) $\text{pH} = 5$ 时的标准 ΔG , (c) $\text{pH} = 5.0$ 时的 $\Delta G_{\#}$.

解:

$$(a) \quad \Delta G^\circ = -1364 \log K_a = -1364 \log (1.75 \times 10^{-5}) = - (1364) (-4.76)$$

$$\Delta G^\circ = +6488 \text{ 卡/摩尔}$$

即, 当 $[\text{HOAc}] = 1M$, $[\text{OAc}^-] = 1M$, 和 $[\text{H}^+] = 1M$ 时, 由于 $[\text{H}^+][\text{OAc}^-]/[\text{HOAc}]$ 的比值 $> K_a$, 所以反应由右向左进行.

$$\begin{aligned}
 (b) \quad \Delta G' &= \Delta G^\circ + 1364 \log [\text{H}^+] = +6488 + 1364 \log (10^{-5}) \\
 &= +6488 + 1364(-5) = +6488 - 6820 \\
 \Delta G' &= -332 \text{ 卡/摩尔}
 \end{aligned}$$

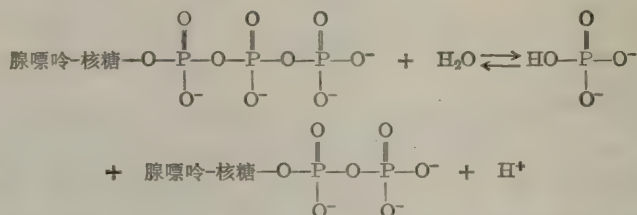
即, 当 $[\text{HOAc}] = 1M$, $[\text{OAc}^-] = 1M$, 和 $[\text{H}^+] = 10^{-5}M$ 时, 由于 $[\text{H}^+][\text{OAc}^-]/[\text{HOAc}]$ 的比值 $< K_a$, 所以反应由左向右进行.

$$\begin{aligned}
 (c) \quad \Delta G_{\text{总}} &= -1364 \log \left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]} \right) \\
 &= -1364 \log \left(1 + \frac{1.75 \times 10^{-5}}{10^{-5}} \right) \\
 &= -1364 \log (1 + 1.75) \\
 &= -1364 \log 2.75 \\
 \Delta G_{\text{总}} &= -599 \text{ 卡/摩尔}
 \end{aligned}$$

即, 当 1 摩尔 HOAc 加到 pH 为 5 的 1 升缓冲液中, HOAc 将电离, 并放出 599 卡的能量. 乙酸的总浓度仍为 1M.

例题 3-2

在 pH7 时, ATP 的水解反应可以写成



(a) 在 25°C, ADP 分子上新形成的电离基团, 其 pK_a 为 6.68 ($K_a = 2.09 \times 10^{-7}$). 若总的 $\Delta G'$ 为 -7700 卡/摩尔, 其中有多少来自 ADP 的电离? (b) ATP 分子上末端磷酸的 pK_a 为 6.95 和 2.3. 由 ATP 末端磷酸衍生的无机磷酸, 其 pK_a 为 12.5, 6.82 和 2.3. 该无机磷酸的电离是否对总的 $\Delta G'$ 有影响?

解:

$$\begin{aligned}
 (a) \quad \Delta G_{\text{总}} &= -1364 \log \left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]} \right) = -1364 \log (1 + 2.09) \\
 &= -1364 \log 3.09 = -1364(0.490) \\
 \Delta G_{\text{总}} &= -668 \text{ 卡/摩尔}
 \end{aligned}$$

(b) 由于 ATP 末端磷酸中最强的酸性基团在水解前后具有相同的 pK_a 值 (2.3), 因此, 它的电离对 $\Delta G'$ 无影响. 新形成的酸性基团, 其 pK_a 为 12.5, 在 pH7 时基本不电离, 因此, 它对 $\Delta G'$ 也无影响. 另一个酸性基团水解后酸性略有增加 (由 $pK_a = 6.95$ 或 $K_a = 1.12 \times 10^{-7}$ 变为 $pK_a = 6.82$ 或 $K_a = 1.51 \times 10^{-7}$). 该酸性基团进一步电离对 $\Delta G'$ 的影响可用式 (29) 计算:

$$\begin{aligned}
 \Delta G_{\text{总}} &= -1364 \log \left(1 + \frac{\Delta K_a}{[\text{H}^+]} \right) \quad (29) \\
 &= -1364 \log (1 + 0.39) = -1364 \log (1.39) \\
 \Delta G_{\text{总}} &= -195 \text{ 卡/摩尔}
 \end{aligned}$$

例题 3-3

在 pH7 和 25°C 时, 酶促水解葡萄糖-6-磷酸使之生成葡萄糖和无机磷酸。反应开始时, 葡萄糖-6-磷酸的浓度为 0.1M。平衡时, 只有 0.05% 的原始葡萄糖-6-磷酸残存。计算 (a) 葡萄糖-6-磷酸水解时的 $K'_{\text{平}}$, (b) 此水解反应的 $\Delta G'$, (c) 无机磷酸和葡萄糖合成葡萄糖-6-磷酸时的 $K'_{\text{平}}$, 以及 (d) 此合成反应的 $\Delta G'$ 。

解:

(a) 水解反应的方程式为: 葡萄糖-6-磷酸 + H₂O \rightleftharpoons 葡萄糖 + P_i。在水为单位活度时, 此水解反应的 $K'_{\text{平}}$ 可表示成

$$K'_{\text{平}} = \frac{[\text{葡萄糖}][\text{P}_i]}{[\text{葡萄糖-6-P}]}$$

式中, $[\text{P}_i] = [\text{HPO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4^-]$, $[\text{葡萄糖-6-P}] = [\text{葡萄糖-6-OPO}_3^{2-} + \text{葡萄糖-6-OPO}_3\text{H}^-]$ 。

平衡时:

$$[\text{葡萄糖-6-P}] = (0.05\%) (0.10M) = (5 \times 10^{-4}) (1 \times 10^{-1}) = 5 \times 10^{-5} M$$

$$[\text{葡萄糖}] = (99.95\%) (0.10M) = (99.95 \times 10^{-2}) (1 \times 10^{-1}) = 99.95 \times 10^{-3} M$$

$$\text{P}_i = [\text{葡萄糖}] \quad \therefore [\text{P}_i] = 99.95 \times 10^{-3} M$$

$$K'_{\text{平}} = \frac{(99.95 \times 10^{-3})(99.95 \times 10^{-3})}{5 \times 10^{-5}} = \frac{9.99 \times 10^{-3}}{5 \times 10^{-5}}$$

$$K'_{\text{平}} = 199.8$$

$$(b) \quad \Delta G' = -1364 \log K'_{\text{平}} = -1364 \log 199.8 = -(1364)(2.301)$$

$$\Delta G' = -3138 \text{ 卡/摩尔}$$

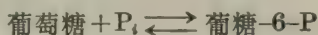
换句话说, 在标准状态条件下, 葡萄糖-6-磷酸, 葡萄糖和 P_i 都保持为单位活度的稳态浓度时, 每 1 摩尔葡萄糖-6-磷酸转变成 1 摩尔葡萄糖和 1 摩尔 P_i 放出 3138 卡能量。

(c) 反应 A \longrightarrow B 的平衡常数乃是反应 B \longrightarrow A 平衡常数的倒数:

$$1. \quad A \longrightarrow B \quad K'_{\text{平}1} = \frac{[\text{B}]}{[\text{A}]}$$

$$2. \quad B \longrightarrow A \quad K'_{\text{平}2} = \frac{[\text{A}]}{[\text{B}]} = \frac{1}{[\text{B}]/[\text{A}]} = \frac{1}{K'_{\text{平}1}}$$

因此, 合成反应



的

$$K'_{\text{平}} = \frac{[\text{葡萄糖-6-P}]}{[\text{葡萄糖}][\text{P}_i]} = \frac{1}{199.8} = 5 \times 10^{-3}$$

(d) 如果葡萄糖-6-磷酸水解时放出 3138 卡/摩尔能量, 那么葡萄糖-6-磷酸合成时就需要 3138 卡/摩尔能量。

$$\therefore \Delta G' = +3138 \text{ 卡/摩尔}$$

$\Delta G'$ 也可由 $K'_{\text{平}}$ 计算

$$\Delta G' = -1364 \log K'_{\text{平}} = -1364 \log 5 \times 10^{-3}$$

$$\Delta G' = -1364 (\log 5 + \log 10^{-3}) = -1364 (0.699 - 3)$$

$$\Delta G' = -1364 (-2.301) \quad \Delta G' = +3138 \text{ 卡/摩尔}$$

例题 3-4

在 pH7、25°C, 以及 ATP、ADP 和 P_i 分别保持 10⁻³M、10⁻⁴M 和 10⁻²M 稳态浓度条件下

(在活细胞中可能有这样的条件), 计算 ATP 水解反应的 ΔG 。

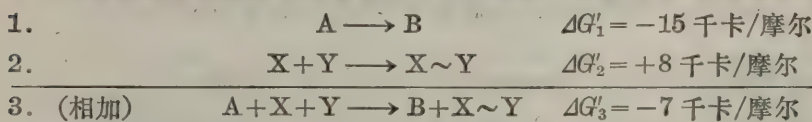
解:

在非标准状态条件下, 计算此水解反应 ΔG 的公式为

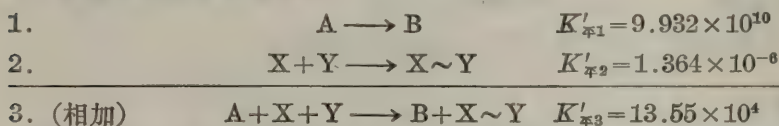
$$\begin{aligned}\Delta G &= \Delta G' + 1364 \log \frac{[\text{ADP}][\text{P}_i]}{[\text{ATP}]} = -7700 + 1364 \log \frac{(10^{-4})(10^{-2})}{(10^{-3})} \\ &= -7700 + 1364 \log 10^{-3} = -7700 + 1364(-3) \\ &= -7700 - 4092 \quad \Delta G = -11,792 \text{ 卡/摩尔}\end{aligned}$$

偶联反应中 ΔG 值的加合性

前面, 我们讲过, 如果 A 转变成 B, 放出 15 千卡能量, 而合成 X~Y 耗用 8 千卡能量, 上二反应偶联的或总的结果将放出 7 千卡能量。由此可见, 能量的数值是可以相加的。



$K'_{\text{平}}$ 数值间的关系则为相乘:



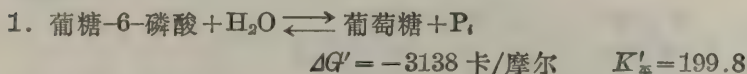
能量的这种相加性使我们有可能用它来求算未知反应的 $\Delta G'$ 值, 如果所欲求的反应可写成两个或两个以上反应的和, 而它们的 $\Delta G'$ 值均为已知。这种情况将在例题 3-5 中说明。

例题 3-5

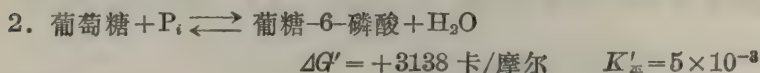
ATP 在 pH7 和 25°C 时水解的 $\Delta G'$ 为 -7700 卡/摩尔。由例题 3-2 得知: 葡萄糖-6-磷酸在 pH7 和 25°C 时水解的 $\Delta G'$ 为 -3138 卡/摩尔。据此, 计算己糖激酶所催化的葡萄糖和 ATP 反应的 $\Delta G'$ 和 $K'_{\text{平}}$ 。

解:

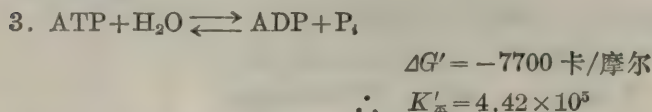
已知



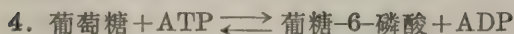
我们可以立即写出



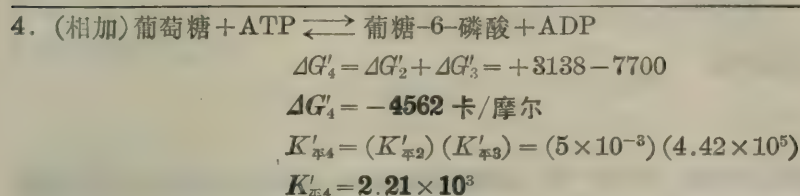
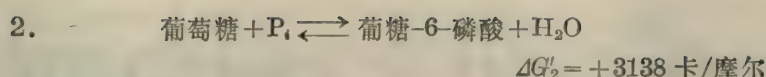
我们还知道



我们所感兴趣的反应是



反应 4 可看做是反应 2 和反应 3 之和:



$$\text{或} \quad \Delta G'_4 = -1364 \log K'_{\mp 4} = -4562$$

$$\log K'_{\mp 4} = \frac{4562}{1364} = 3.3445 \quad \therefore K'_{\mp 4} = 2.21 \times 10^3$$

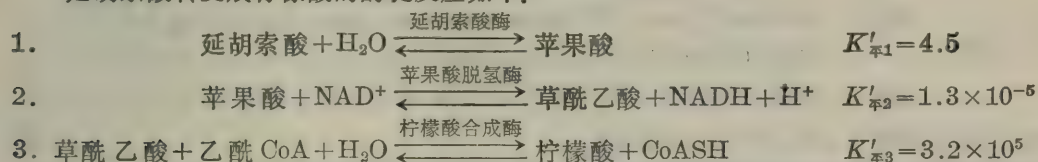
例题 3-6

在有适当的酶, 共底物 (cosubstrates) 和辅助因子存在时, 计算在 pH7、25°C, 延胡索酸转变成柠檬酸的总 K'_{\mp} 和总 $\Delta G'$ 。

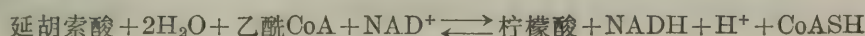
解:

上一题我们讨论了, 某单一反应可以用两个或更多的偶联或连续反应之和来表示。本题我们将讨论实际分三步连续进行的反应。计算 K'_{\mp} 和 $\Delta G'$ 的法则是同样的。

延胡索酸转变成柠檬酸的酶促反应如下:



4. (相加)



$$K'_{\mp 4} = \frac{[\text{柠檬酸}][\text{NADH}][\text{CoASH}]}{[\text{延胡索酸}][\text{乙酰 CoA}][\text{NAD}^+]}$$

$$K'_{\mp 4} = K'_{\mp 1} \times K'_{\mp 2} \times K'_{\mp 3} = (4.5)(1.3 \times 10^{-5})(3.2 \times 10^5)$$

$$K'_{\mp 4} = 18.72$$

$$\Delta G'_4 = -1364 \log K'_{\mp 4} = -1364(1.272)$$

$$\Delta G'_4 = -1735 \text{ 卡/摩尔}$$

我们可以看到, 尽管反应 2 的 $K'_{\mp 2}$ 数值低, 但总的结果仍有利于延胡索酸向柠檬酸的转变。本题和前面的一些例题阐明了某些一般性的法则和原理, 总结如下。

一般原理

1. 分多步进行的连续反应 1, 2, 3, 4, ..., 其总平衡常数 K'_{\mp} 等于各步反应平衡常数之积, 即 $K'_{\mp} = K'_{\mp 1} \times K'_{\mp 2} \times K'_{\mp 3} \times K'_{\mp 4} \cdots$ 。

2. 分多步进行的连续反应 1, 2, 3, 4, ..., 其总标准自由能 $\Delta G'$ 等于各步反应标准自由能之和, 即 $\Delta G' = \Delta G'_1 + \Delta G'_2 + \Delta G'_3 + \Delta G'_4 \cdots$ 。 $\Delta G'_{\text{总}}$ 也可由 $K'_{\mp \text{总}}$ 计算

$$\Delta G'_{\text{总}} = -2.3RT \log K'_{\text{平总}}$$

3. 可表示成两个或更多的连续反应之和的某单一反应, 其平衡常数 $K'_{\text{平总}}$ 等于各个反应平衡常数之积, 即 $K'_{\text{平总}} = K'_{\text{平1}} \times K'_{\text{平2}} \times K'_{\text{平3}} \cdots$; 同理, 其标准自由能等于各个反应标准自由能之和, 即 $\Delta G'_{\text{总}} = \Delta G'_1 + \Delta G'_2 + \Delta G'_3 + \cdots$, 且有

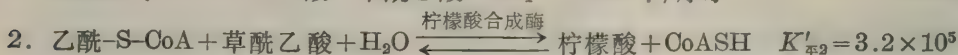
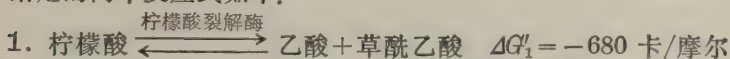
$$\Delta G'_{\text{总}} = -2.3RT \log K'_{\text{平总}}$$

再举一些例子来说明这些原理.

例题 3-7

柠檬酸解裂成乙酸和草酰乙酸时, 其 $\Delta G'$ 为 -680 卡/摩尔. 由柠檬酸合成酶所催化的反应, $K'_{\text{平}}$ 为 3.2×10^5 . 据此, 计算乙酰-S-CoA 水解时的标准自由能和该水解反应的 $K'_{\text{平}}$. 解:

给定的两个反应式如下:



我们可通过 $\Delta G'$ 或 $K'_{\text{平}}$ 求解这道题. 首先计算缺欠的 $\Delta G'$ 或 $K'_{\text{平}}$.

$$\Delta G'_1 = -1364 \log K'_{\text{平1}} = -680 \text{ 卡/摩尔}$$

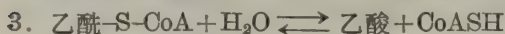
$$\log K'_{\text{平1}} = \frac{-680}{-1364} = 0.4985$$

$$K'_{\text{平1}} = \text{antilog } 0.4985 \quad K'_{\text{平1}} = 3.15$$

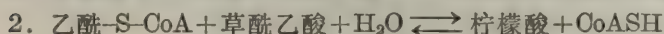
$$\begin{aligned} \Delta G'_2 &= -1364 \log K'_{\text{平2}} = -1364 \log 3.2 \times 10^5 = -1364 (\log 3.2 + \log 10^5) \\ &= -1364 (0.505 + 5) = -1364 (5.505) \end{aligned}$$

$$\Delta G'_2 = -7509 \text{ 卡/摩尔}$$

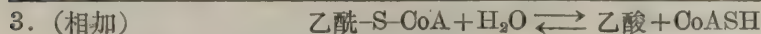
我们所感兴趣的是乙酰-S-CoA 水解反应.



这个反应能不能用已给定的反应式表达呢? 我们可以看出, 反应 3 实为反应 1 和反应 2 之和.



$$\Delta G'_2 = -7509 \text{ 卡/摩尔} \quad K'_{\text{平2}} = 3.2 \times 10^5$$



$$\begin{aligned} \Delta G'_3 &= \Delta G'_1 + \Delta G'_2 \\ &= (-680) + (-7509) \end{aligned}$$

$$\Delta G'_3 = -8189 \text{ 卡/摩尔}$$

$$\Delta G'_3 = -1364 \log K'_{\text{平3}}$$

$$-8189 = -1364 \log K'_{\text{平3}}$$

$$\frac{-8189}{-1364} = \log K'_{\text{平3}} = 6$$

$$K'_{\text{平3}} = 10^6$$

$$\begin{aligned} K'_{\text{平3}} &= K'_{\text{平1}} \times K'_{\text{平2}} \\ &= (3.15) (3.2 \times 10^5) \end{aligned}$$

$$K'_{\text{平3}} = 10.08 \times 10^5$$

$$\Delta G'_3 = -1364 \log K'_{\text{平3}}$$

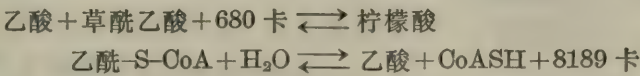
$$= -1364 \log 10.08 \times 10^5$$

$$\Delta G'_3 = -1364 (6.003)$$

$$\Delta G'_3 = -8189 \text{ 卡/摩尔}$$

我们也可以通过另外一条推理途径来确定乙酰-S-CoA 水解时的 $\Delta G'$. 假如柠檬酸解

裂成乙酸和草酰乙酸时放出 680 卡/摩尔能量, 那么, 从乙酸和草酰乙酸合成柠檬酸时就需要 680 卡/摩尔能量。当这个合成反应由乙酰-S-CoA (乙酸的“活化”形式) 促进时, 有 7509 卡/摩尔能量放出。那么, 乙酰-S-CoA 必须含有足够形成一个新的碳-碳键的能量(680 卡/摩尔), 并有 7509 卡/摩尔的剩余。这就是说, 乙酰-S-CoA 相当于具有 $680+7509=8189$ 卡/摩尔的“基团转移势”(或“水解自由能”)。由柠檬酸合成酶所催化的反应, 可以看做是两个紧密偶联反应之和。



相加: $\text{乙酰-S-CoA} + \text{H}_2\text{O} + \text{草酰乙酸} \rightleftharpoons \text{柠檬酸} + \text{CoASH} + 7509 \text{ 卡}$
这一情况恰与己糖激酶所催化的反应相似。一个高能化合物在反应中同时提供了能量和特殊的基团。该能量用以推动吸能反应的进行; 该特殊的基团则转移给受体。

一般原理

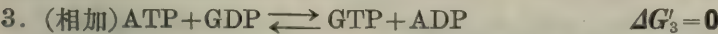
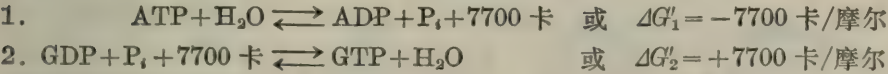
吸能反应同高度放能反应偶联就能进行到底。该偶联方式可以紧密到使总的偶联反应表现为一步反应(如己糖激酶或柠檬酸合成酶所催化的反应), 但也可以通过两个或更多的连续步骤来实现(如延胡索酸 \rightarrow 柠檬酸的反应顺序)。在顺序反应中, 我们可以认为前面的吸能反应只要一形成产物, 就立即被后面的放能反应消耗掉, 因此, 推动总的反应顺序向右进行。

例题 3-8

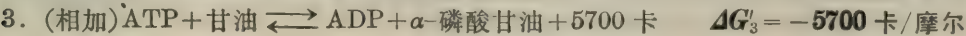
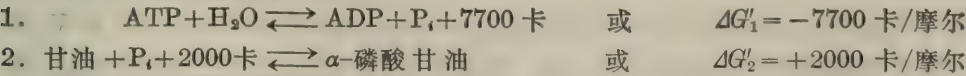
估计下列反应的 $\Delta G'$: (a) $\text{ATP} + \text{GDP} \rightleftharpoons \text{GTP} + \text{ADP}$, (b) $\text{甘油} + \text{ATP} \rightleftharpoons \alpha\text{-磷酸甘油} + \text{ADP}$, 和 (c) $3\text{-磷酸甘油酸} + \text{ATP} \rightleftharpoons 1, 3\text{-二磷酸甘油酸} + \text{ADP}$ 。

解:

(a) 在这个反应中, ATP 的能量(基团转移势)用于转移其末端磷酸给 GDP。产物(GTP)本身也是一个“高能”化合物, 而且 GTP 的基团转移势同 ATP 一般大。因此, 该反应的 $\Delta G' = 0$, $K'_{\text{eq}} = 1$ 。把上述反应看做是下面两个组分反应之和, 就可以用数学方法证实这个结论。



(b) 在这个反应中, ATP 的能量用于转移其末端磷酸给甘油, 形成一个“低能”的磷酸酯。 α -磷酸甘油水解时, $\Delta G'$ 约为 -2000 卡/摩尔, 而 ATP 的末端磷酸水解时, $\Delta G'$ 约为 -7700 卡/摩尔。因而, ATP 原有的 7700 卡能量中只有 2000 卡被保留。反应的 $\Delta G'$ 为 -7700 卡和 -2000 卡之差, 或等于 -5700 卡/摩尔。把这个反应看做是下面两个组分反应之和, 我们也可以用数学方法来证实。



(o) 这个反应的产物, 1, 3-二磷酸甘油酸, 较 ATP 更“高能”(水解时的 $\Delta G' = -12,000$ 卡/摩尔)。因此, 这个反应按书写式是吸能的。我们可以将这个反应看做是下面两个组分反应之和。

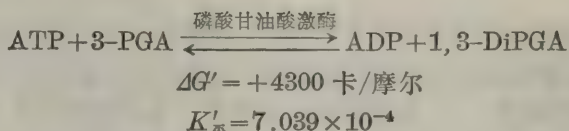
1. $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{P}_i + 7700 \text{ 卡}$ 或 $\Delta G'_1 = -7700 \text{ 卡/摩尔}$
2. $3\text{-PGA} + \text{P}_i + 12,000 \text{ 卡} \rightleftharpoons 1, 3\text{-DiPGA} + \text{H}_2\text{O}$ 或 $\Delta G'_2 = +12,000 \text{ 卡/摩尔}$
3. (相加) $\text{ATP} + 3\text{-PGA} + 4300 \text{ 卡} \rightleftharpoons \text{ADP} + 1, 3\text{-DiPGA}$ 或 $\Delta G'_3 = +4300 \text{ 卡/摩尔}$

例题 3-9

在具有活跃呼吸的酵母细胞中, ATP/ADP 的比值约等于 10。要使这个由磷酸甘油酸激酶所催化的反应向着热力学上有利于合成 1, 3-二磷酸甘油酸的方向进行, 细胞内 3-磷酸甘油酸/1, 3-二磷酸甘油酸的比值应是多少?

解:

磷酸甘油酸激酶所催化的反应为



$\Delta G'$ 为正值表明在标准状态条件下合成 1, 3-DiPGA 是吸能反应 ($\Delta G' = 4300$ 卡/摩尔)。换句话说, 如果参与反应的 4 种组分都维持 1M 的稳态浓度, 反应将自发地向着形成 ATP 和 3-PGA 的方向进行, 并放出 4300 卡/摩尔能量。但是, 在活细胞中, ATP、ADP、3PGA 和 1, 3-DiPGA 的浓度并不是维持在 1M。如果这些组分的浓度维持在适当的水平是能够使反应向着生成 1, 3-DiPGA 和 ADP 的方向自发进行的。从定性的角度看, 我们知道, 只要充分地增大 ATP 和 3-PGA 的浓度, 或降低 ADP 和 1, 3-DiPGA 的浓度, 或二者结合, 就可以使反应自发地由左向右进行。我们只需要计算出 $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ 比值等于 10, $\Delta G' = 0$ 时的 $[3\text{-PGA}]/[1, 3\text{-DiPGA}]$ 比值。换句话说, 我们要计算的是与 $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ 比值为 10 相平衡的 $[3\text{-PGA}]/[1, 3\text{-DiPGA}]$ 的比值。

$$K'_{\text{平}} = \frac{[\text{ADP}][1, 3\text{-DiPGA}]}{[\text{ATP}][3\text{-PGA}]} = 7.039 \times 10^{-4}$$

$$\frac{[3\text{-PGA}]}{[1, 3\text{-DiPGA}]} = \frac{[\text{ADP}]}{[\text{ATP}] K'_{\text{平}}} = \frac{(1)}{(10)(7.039 \times 10^{-4})} = 142$$

因之, 当 ATP/ADP 的比值为 10, 3-PGA/1, 3-DiPGA 的比值为 142 时, 由磷酸甘油酸激酶所催化的反应将处于平衡状态。只要略微增加 ATP/ADP 或 3-PGA/1, 3-DiPGA 的比值, 反应就向着生成 ADP 和 1, 3-DiPGA 的方向进行——使 $\Delta G'$ 为负值。因而, 本题阐明了另一个一般原理。

一般原理

虽然 $\Delta G'$ (或 $K'_{\text{平}}$) 的数值为各种不同反应的分类和列表提供了便利, 但是 $\Delta G'$ 或 $K'_{\text{平}}$ 的数值并不能表明活细胞中反应进行的方向性。活体中自发过程的方向性 (非标准状态下的 ΔG 值) 取决于细胞内参与反应的各种组分浓度 (活度)。

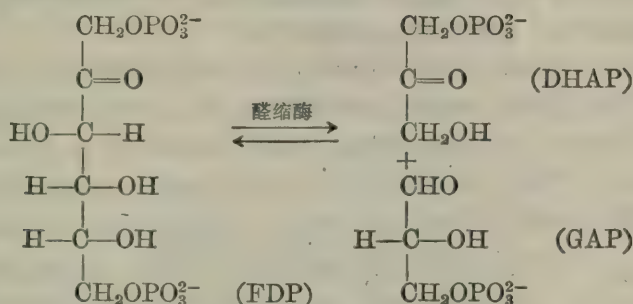
B. 平衡浓度的计算

例题 3-10

在 25°C 和 pH7 时, 果糖-1, 6-二磷酸醛缩酶所催化的反应(按生成磷酸丙糖的方向书写), 其 $K'_{\text{平}}$ 约为 $10^{-4}M$ 、 $\Delta G' = +5456$ 卡/摩尔。当果糖-1, 6-二磷酸的初始浓度为(a) $1M$, (b) $10^{-2}M$, (c) $2 \times 10^{-4}M$ 和 (d) $10^{-5}M$ 时, 计算果糖-1, 6-二磷酸 (FDP)、二羟丙酮磷酸 (DHAP) 和甘油醛-3-磷酸 (GAP) 的平衡浓度。

解:

FDP-醛缩酶所催化的反应如下:



(a) 设

$y = \text{FDP 消失的 } M$

$\therefore y = \text{DHAP 生成的 } M, y = \text{GAP 生成的 } M$

则

$(1-y) = \text{FDP 剩余的 } M$



初始浓度	1	0	0
浓度变化	$-y$	$+y$	$+y$
平衡时浓度	$1-y$	y	y

$$K'_{\text{平}} = \frac{(y)(y)}{(1-y)} = 10^{-4}$$

先计算 y , 假设 y 与 $1M$ 相比小好多, 因此分母中的 y 可以忽略不计。

$$K'_{\text{平}} = \frac{(y)(y)}{(1)} = 10^{-4} \quad y^2 = 10^{-4} \quad y = 10^{-2}$$

\therefore 平衡时:

$$[\text{DHAP}] = 10^{-2}M$$

$$[\text{GAP}] = 10^{-2}M$$

$$[\text{FDP}] = 99 \times 10^{-2}M$$

我们假定 y 与 $1M$ 相比要小好多是有根据的。我们可以看到, 在 FDP 的初始浓度较高时, 只有 DHAP 和 GAP 的浓度比 FDP 的浓度小好多, 才能使反应达到平衡。

(b) 当 FDP 的初始浓度为 $0.01M$ 时,

$$K'_{\text{平}} = \frac{(y)(y)}{(0.01-y)} = 10^{-4}$$

我们仍假定 y 与 $0.01M$ 相比小好多, 于是

$$K'_{\frac{1}{2}} = \frac{(y)(y)}{(0.01)} = 10^{-4} \quad y^2 = 10^{-6} \quad y = 10^{-3}$$

∴ 平衡时:

$$[\text{DHAP}] = 10^{-3}M$$

$$[\text{GAP}] = 10^{-3}M$$

$$[\text{FDP}] = 9 \times 10^{-3}M$$

在这些条件下, y 约为 $[\text{FDP}]$ 的 10%, 因此, 在分母中略去 y 仍可给出正确合理的答案(若按二次方程式求解, $y = 9.5 \times 10^{-4}M$).

(c) 当 FDP 的初始浓度为 $2 \times 10^{-4}M$ 时,

$$K'_{\frac{1}{2}} = \frac{(y)(y)}{(2 \times 10^{-4} - y)} = 10^{-4}$$

从(a)和(b)的计算中我们看到这样一种趋向, 即当 FDP 的初始浓度降低时, y 的数值变大. 为了准确地求解(c), 分母中的 y 不能再忽略了.

斜乘

$$y^2 = (10^{-4})(2 \times 10^{-4} - y) = 2 \times 10^{-8} - 10^{-4}y$$

$$y^2 + 10^{-4}y - 2 \times 10^{-8} = 0$$

$$y = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

将 $a=1$, $b=10^{-4}$ 和 $c=-2 \times 10^{-8}$ 代入,

$$y = \frac{-10^{-4} \pm \sqrt{(10^{-4})^2 - 4(1)(-2 \times 10^{-8})}}{2}$$

$$y = \frac{-10^{-4} \pm \sqrt{10^{-8} + 8 \times 10^{-8}}}{2} = \frac{-10^{-4} \pm \sqrt{9 \times 10^{-8}}}{2}$$

$$y = \frac{-10^{-4} \pm 3 \times 10^{-4}}{2} = \frac{-4 \times 10^{-4}}{2} \quad \text{和} \quad \frac{+2 \times 10^{-4}}{2}$$

$$= -2 \times 10^{-4} \quad \text{和} \quad 1 \times 10^{-4}$$

y 为负值显然是不合理的,

$$\therefore y = 10^{-4}$$

∴ 平衡时:

$$[\text{DHAP}] = 10^{-4}M$$

$$[\text{GAP}] = 10^{-4}M$$

$$[\text{FDP}] = 10^{-4}M$$

因而, 当 FDP 的初始浓度为 $2 \times 10^{-4}M$, 反应达到平衡时, 三种组分的浓度均为 $10^{-4}M$.

(d) 当 FDP 的初始浓度为 $10^{-5}M$ 时,

$$K'_{\frac{1}{2}} = \frac{(y)(y)}{(10^{-5} - y)} = 10^{-4} \quad y^2 = 10^{-9} - 10^{-4}y$$

$$y^2 + 10^{-4}y - 10^{-9} = 0 \quad y = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

将 $a=1$, $b=10^{-4}$ 和 $c=-10^{-9}$ 代入,

$$y = \frac{-10^{-4} \pm \sqrt{(10^{-4})^2 - 4(1)(-10^{-9})}}{2} = \frac{-10^{-4} \pm \sqrt{10^{-8} + 4 \times 10^{-9}}}{2}$$

$$y = \frac{-10^{-4} \pm \sqrt{10^{-8} + 0.4 \times 10^{-8}}}{2} = \frac{-10^{-4} \pm \sqrt{1.4 \times 10^{-8}}}{2}$$

$$y = \frac{-10^{-4} \pm 1.183 \times 10^{-4}}{2} = \frac{-2.183 \times 10^{-4}}{2} \quad \text{和} \quad \frac{+0.183 \times 10^{-4}}{2}$$

舍去负值,

$$y = 0.0915 \times 10^{-4} = 9.15 \times 10^{-6}$$

$$\therefore \text{平衡时:} \quad [\text{DHAP}] = 9.15 \times 10^{-6} M$$

$$[\text{GAP}] = 9.15 \times 10^{-6} M$$

$$[\text{FDP}] = 8.5 \times 10^{-7} M$$

从本题我们可以看到, 尽管这个反应的 $K'_{\text{平}}$ 很小 (10^{-4}), 而且 $\Delta G'$ 为正值 (+5456 卡/摩尔), 但是我们不能机械地认为, 平衡时, FDP 永远多于 DHAP 或 GAP. 反应中各组分的相对比例取决于起始化合物的初始浓度. 这种现象只要在反应式两侧组分数目不相等时都可见到(参看第一章中的“浓度对解离度的影响”一节).

C. 氧化还原反应

活细胞中的许多反应是氧化还原反应. 附录 IX 列出一些具有生物学重要意义的化合物, 并给出了这些化合物在 25°C、pH7 和标准状态下获得电子的相对趋势. E'_0 的数值是相对于 $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2$ 电极而言的还原电极势, 该氢电极在 pH7 时取做 -0.42 伏. 此氢电极在 pH7 时的这个数值是根据在真正的标准状态条件下 ($1M\text{H}^+$ 和 1 大气压 H_2) 硬性规定氢电极的 E_0 为 0.00 伏计算出来的. 对那些为数不多的, 不含有 H^+ 做为反应物的, 具有生物学重要意义的电极反应, 其 E_0 与 E'_0 的数值基本相同.

因为没有一种物质能得到电子而不需要另一种物质失去电子, 所以一个完全的氧化还原反应必须由两个电极反应组成. 任意两个电极反应偶联时, 得电子趋势较强的那个电极反应(它的还原电极势有较大正值)将按照书写式方向(还原作用)进行变化. 而另一个电极反应(它的还原电极势有较小的正值, 得电子的趋势较弱)则按与书写式相反的方向(氧化作用)进行变化. 还原电极势负值高的物质, 其还原态是良还原剂(本身易氧化). 还原电极势正值高的物质, 其氧化态是良氧化剂(本身易还原).

氧化态		还原态	相对 E'_0 值
↑ 作为氧化剂的能力依 箭头方向增强	A	$+2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{AH}_2$	+3
	B	$+2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{BH}_2$	+2
	C	$+2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{CH}_2$	+1
	D	$+2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{DH}_2$	0
	E	$+2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{EH}_2$	-1
	F	$+2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{FH}_2$	-2
	G	$+2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{GH}_2$	-3
		↓ 作为还原剂的能力依 箭头方向增强	

举例来说, 做为还原剂, EH_2 的还原能力比 DH_2 , CH_2 , BH_2 或 AH_2 强, 但比 FH_2 或 GH_2 弱. 做为氧化剂, C 的氧化能力比 D、E、F 或 G 强, 但比 B 或 A 弱. 换句话说, 强氧化剂是那些易于还原的物质; 强还原剂是那些易于氧化的物质.

总氧化还原反应进行的相对趋势可根据组成电极反应的还原电极势之差来计算:

$$\Delta E'_0 = [\text{含有氧化剂的电极反应的 } E'_0 \text{ 值}]$$

$$- [\text{含有还原剂的电极反应的 } E'_0 \text{ 值}]$$

(30)

如果氧化剂和还原剂没有弄错, (30) 式计算出的 $\Delta E'_0$ 常为正值. E'_0 的数值可看做是电子

压, 因此, E'_0 的数值与电极反应中电子的数目无关。氧化还原反应的 $\Delta G'$ 可由下面的关系式计算:

$$\Delta G' = -n\mathcal{F}\Delta E'_0 \quad (31)$$

式中 n 为每摩尔传递的电子数 (即每摩尔的当量数, \mathcal{F} 为法拉第常数 ($23,063 \text{ 卡} \times \text{伏}^{-1} \times \text{当量}^{-1}$), 为一将伏/当量变换成卡/当量的变换因子。我们可以看到, “自发”反应 (即 $\Delta G'$ 为负值的反应) 的 $\Delta E'_0$ 一定是正值。

氧化还原反应的 K'_\mp 与 $\Delta G'$ (因而也与 $\Delta E'_0$) 有如下关系:

$$\begin{aligned} \Delta G' &= -2.3RT \log K'_\mp \quad \text{而} \quad \Delta G' = -n\mathcal{F}\Delta E'_0 \\ \therefore \Delta E'_0 &= \frac{2.3RT}{n\mathcal{F}} \log K'_\mp \end{aligned} \quad (32)$$

或

$$\Delta E'_0 = \frac{0.059}{n} = \log K'_\mp \quad \text{在 } 25^\circ\text{C} \quad (33)$$

电极反应中氧化态和还原态物质若处于非标准状态浓度, 其还原电极势可用下面的 Nernst 方程式计算:

$$E = E'_0 + \frac{2.3RT}{n\mathcal{F}} \log \frac{[\text{氧化态}]}{[\text{还原态}]} \quad (34)$$

或

$$E = E'_0 + \frac{0.059}{n} \log \frac{[\text{氧化态}]}{[\text{还原态}]} \quad \text{在 } 25^\circ\text{C} \quad (35)$$

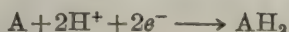
对于 $A_{\text{氧}} + B_{\text{还}} \longrightarrow A_{\text{还}} + B_{\text{氧}}$ 这个反应, 在非标准状态下它的 ΔE 可以写成

$$\Delta E = \Delta E'_0 - \frac{2.3RT}{n\mathcal{F}} \log \frac{[A_{\text{还}}][B_{\text{氧}}]}{[A_{\text{氧}}][B_{\text{还}}]} \quad (36)$$

(36) 式与 (23) 式相似。我们从式 (34) 中可以看到, 既或是在非标准状态下, 只要组成电极反应的化合物只有一个氧化态和一个还原态, 而且它们的浓度相等, E 就等于 E'_0 。

pH 对 E'_0 的影响

如果在某一 pH 下电极反应的 E'_0 值为已知, 我们可用式 (35) 推测在另一 pH 下的 E'_0 值。例如, 某电极反应:



在 25°C 和非标准状态下 E 与 E'_0 的关系为

$$E = E'_0 + \frac{0.059}{2} \log \frac{[A][H^+]^2}{[AH_2]} \quad (37)$$

如果 $[A]$ 和 $[AH_2]$ 都是 $1M$ (或浓度相等), 式 (37) 中的 E 即是 E'_0 :

$$\begin{aligned} E'_0 &= E'_0 + \frac{0.059}{2} \log [H^+]^2 = E'_0 + 0.059 \log [H^+] \\ &= E'_0 - 0.059 \log \frac{1}{[H^+]} \quad E'_0 = E'_0 - 0.059 \text{pH} \end{aligned} \quad (38)$$

因此, pH 每增加 1 个单位, E'_0 就变负 0.059 伏

例题 3-11

(a) 电极反应 $2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$ 的 E'_0 任意规定为零。计算在 pH8 时之 E'_0 。(b) 电极反应

$\text{NAD}^+ + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$ 在 pH7 时的 E'_0 为 -0.32 伏. 计算在 pH5 时之 E'_0 .

解:

$$(a) \quad E'_0 = E_0 - 0.059\text{pH} = E_0 - (0.059)(8) = 0 - 0.472$$

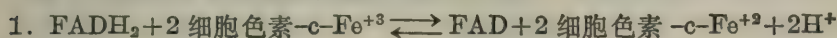
$$E'_0 = -0.472 \text{ 伏}$$

$$(b) \quad E'_{0\text{pH5}} = E'_{0\text{pH7}} - (0.059)(5-7) = (-0.32) - (0.059)(-2) \\ = -0.32 + 0.118$$

$$E'_{0\text{pH5}} = -0.202 \text{ 伏}$$

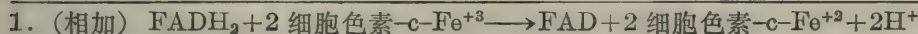
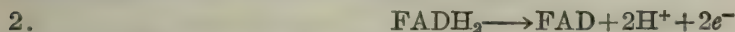
例题 3-12

计算下列反应的 $\Delta G'$ 和 K'_{\mp} 值.

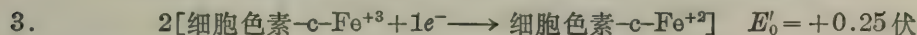
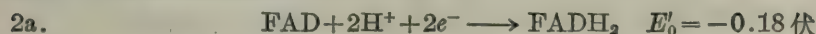


解:

总反应可写成两个电极反应之和:



这两个电极反应写成还原作用形式如下:



细胞色素-c-Fe⁺³/细胞色素-c-Fe⁺² 电极反应的 E'_0 值比 FAD/FADH₂ 电极反应为正. 因之, 电极反应 3 按书写的反应式变化, 并促使电极反应 2a 向相反的方向变化——按氧化作用方式变化. 总自发反应(在标准状态条件下)的方向则如反应式 1 所示. 细胞色素-c-Fe⁺³(氧化剂)将 FADH₂(还原剂)氧化成 FAD.

$$\Delta E'_0 = (\text{含有氧化剂的电极反应的 } E'_0) \\ - (\text{含有还原剂的电极反应的 } E'_0)$$

$$\Delta E'_0 = (0.25) - (-0.18) = 0.25 + 0.18$$

$$\Delta E'_0 = +0.43 \text{ 伏}$$

注意, 在计算 $\Delta E'_0$ 时, 细胞色素-c-Fe⁺³/细胞色素-c-Fe⁺² 电极反应的 E'_0 值并未乘 2. 在计算 $\Delta G'$ 和 K'_{\mp} 时已经把每摩尔 FADH₂ 需要 2 摩尔细胞色素 c 与之反应的事实考虑在内了.

$$\Delta G' = -n\mathcal{F}\Delta E'_0 = -(2)(23,063)(0.43)$$

$$\Delta G' = -19,834 \text{ 卡/摩尔 FADH}_2$$

$$= -9917 \text{ 卡/摩尔细胞色素 c}$$

$$\Delta G' = -1364 \log K'_{\mp} \quad \log K'_{\mp} = \frac{-19,834}{-1364} = 14.54$$

$$K'_{\mp} = \text{antilog } 14.54 \quad K'_{\mp} = 3.467 \times 10^{14}$$

式中,

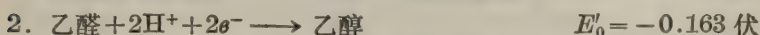
$$K'_{\mp} = \frac{[\text{FAD}][\text{细胞色素-c-Fe}^{+2}]^2}{[\text{FADH}_2][\text{细胞色素-c-Fe}^{+3}]^2}$$

例题 3-13

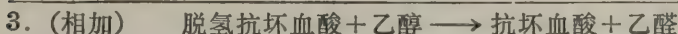
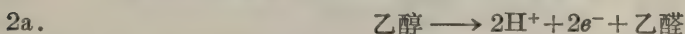
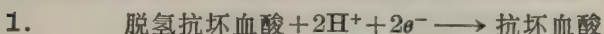
某含有 0.2M 脱氢抗坏血酸和 0.2M 抗坏血酸的溶液, 在 25°C 和 pH7 时, 与等体积的含有 0.01M 乙醛和 0.01M 乙醇的溶液混合。(a) 写出热力学上能进行反应的方程式。(b) 计算反应的 $\Delta E'_0$ 和 $\Delta G'$ 。

解:

(a) 有关电极反应及其标准还原电极势数值如下:



在标准状态条件下, 脱氢抗坏血酸得到电子被还原, 乙醇失去电子被氧化。



(氧化剂) (还原剂)

虽然在最后的溶液中脱氢抗坏血酸和抗坏血酸的浓度都是 0.1M, 而乙醇和乙醛的浓度都是 0.005M, 但每一氧化-还原偶的浓度比都是 1。因此, 每一电极反应的 E 值等于其相应的 E'_0 值。在反应式一侧, 某物质因具有高浓度的氧化态所得到的好处, 恰为另一侧具有同样高浓度的还原态所抵销。自发反应的方向与标准状态下所推测的方向相同。

(b) $\Delta E'_0 = (\text{含有氧化剂的电极反应的 } E'_0)$

$- (\text{含有还原剂的电极反应的 } E'_0)$

$\Delta E'_0 = (+0.060) - (-0.163) = (+0.06) + (0.163)$

$\Delta E'_0 = +0.223$ 伏

$\Delta G' = -n\mathcal{F}\Delta E'_0 = -(2)(23,063)(0.223)$

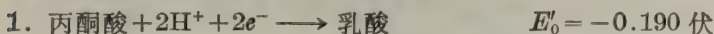
$\Delta G' = -10,286$ 卡/摩尔

例题 3-14

将乳酸脱氢酶加到含有丙酮酸、乳酸、 NAD^+ 和 $NADH$ 的溶液中, 它们的浓度比如下: (a) 乳酸/丙酮酸 = 1, $NAD^+/NADH = 1$, (b) 乳酸/丙酮酸 = 159, $NAD^+/NADH = 159$, 和 (c) 乳酸/丙酮酸 = 1000, $NAD^+/NADH = 1000$ 。写出自发反应式并计算反应的 ΔG 。

解:

有关电极反应及其标准还原电极势如下:



(a) 在标准状态条件下, 或乳酸/丙酮酸和 $NAD^+/NADH$ 的浓度比为 1 时, 丙酮酸/乳酸电极反应的变化如书写的反应式所示, 而 $NAD^+/NADH$ 电极反应则向相反的方向变化(按氧化作用方式变化)。总的自发反应式为



$\Delta E'_0 = (-0.190) - (-0.320) = +0.130$

在这个反应中, $NADH$ 是还原剂, 丙酮酸是氧化剂。

$$\Delta G' = -n\mathcal{F}\Delta E'_0 = -(2)(23,063)(0.130)$$

$$\Delta G' = -5996 \text{ 卡/摩尔}$$

(b) 如果不是处于标准状态条件, 而是反应混合物中乳酸/丙酮酸和 NAD^+/NADH 的浓度比均为 159:1, 其电极反应就有新的还原电极势数值如下所示:

$$\begin{aligned} 1. \quad E_1 &= -0.190 + \frac{0.059}{2} \log \frac{[\text{丙酮酸}]}{[\text{乳酸}]} = -0.190 + 0.0295 \log \frac{1}{159} \\ &= -0.190 - 0.0295 \log 159 = -0.190 - 0.0295(2.201) = -0.190 - 0.065 \end{aligned}$$

$$E_1 = -0.255 \text{ 伏}$$

$$\begin{aligned} 2. \quad E_2 &= -0.320 + \frac{0.059}{2} \log \frac{[\text{NAD}^+]}{[\text{NADH}]} = -0.320 + 0.0295 \log 159 \\ &= -0.320 + 0.0295(2.201) = -0.320 + 0.065 \end{aligned}$$

$$E_2 = -0.255 \text{ 伏}$$

在这种浓度比的情况下, 该两个电极反应具有相同的 E 值; ΔE 为零, 因此 $\Delta G = 0$. 换句话说, 在所给出的浓度比时, 反应已经达到平衡, 不再进行净变化.

(c) 现在假定乳酸/丙酮酸和 NAD^+/NADH 的浓度比均为 1000:1. 在这种条件下, 该两个电极反应的还原电极势数值如下:

$$\begin{aligned} 1. \quad E_1 &= -0.190 + 0.0295 \log \frac{1}{1000} = -0.190 - 0.0295 \log 1000 \\ &= -0.190 - 0.0295(3) = -0.190 - 0.089 \end{aligned}$$

$$E_1 = -0.279 \text{ 伏}$$

$$\begin{aligned} 2. \quad E_2 &= -0.320 + 0.0295 \log 1000 \\ &= -0.320 + 0.0295(3) = -0.320 + 0.089 \end{aligned}$$

$$E_2 = -0.231 \text{ 伏}$$

现在 NAD^+/NADH 电极反应具有较正的还原电极势, 因此, 该电极反应按书写的反应式变化 (按还原作用方式变化), 并促使丙酮酸/乳酸电极反应向相反的方向变化 (按氧化作用方式变化). 在这个反应中, 乳酸是还原剂, NAD^+ 是氧化剂. 总的自发反应式为



$$\Delta E = (-0.231) - (-0.279) = -(0.231) + (0.279)$$

$$\Delta E = +0.048 \text{ 伏}$$

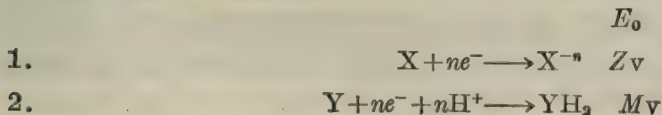
$$\Delta G = -n\mathcal{F}\Delta E = -(2)(23,063)(0.048)$$

$$\Delta G = -2214 \text{ 卡/摩尔}$$

我们也可以用公式(36)求 ΔE . 如将反应式写成: $\text{丙酮酸} + \text{NADH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{乳酸} + \text{NAD}^+$, 其 $\Delta E'_0 = 0.130$, 则计算所得之 ΔE 将是负值, 说明这个反应确实是向相反的方向变化.

pH 电极

设有两个电极反应如下:



反应 1 代表 E_0 为已知的电极反应(例如, 当量甘汞电极: $\text{Hg}_2\text{Cl}_2 + 2e^- \longrightarrow 2\text{Hg}^0 + 2\text{Cl}^-$, 或银/氯化银电极: $\text{AgCl} + 1e^- \longrightarrow \text{Ag}^0 + \text{Cl}^-$)。反应 2 代表任一个与 H^+ 离子浓度有关的电极反应(即 $\text{H}^+ + 1e^- \longrightarrow \frac{1}{2} \text{H}_2$)。如果反应 1 的 E_0 值及 X 和 X^{n-} 的浓度均为已知, 那么, 电极反应 1 的 E 值就确定了。再者, 如果总氧化-还原反应的 ΔE 值可以测量, 而且反应 2 的 E_0 值及 Y 和 YH_2 的浓度也已知道, 那么, 仅有的未知数(H^+ 离子浓度)就可以计算了。据此, 氧化-还原反应可用于测定溶液的 pH 值。

实用上, 商品 pH 计常使用“玻璃电极”和“参比电极”测定 pH。玻璃电极的 E 值(电极势), 不是由于氧化-还原反应引起的, 而是由于 H^+ 离子通透玻璃薄膜的结果。玻璃电极的装置见图 3-3。

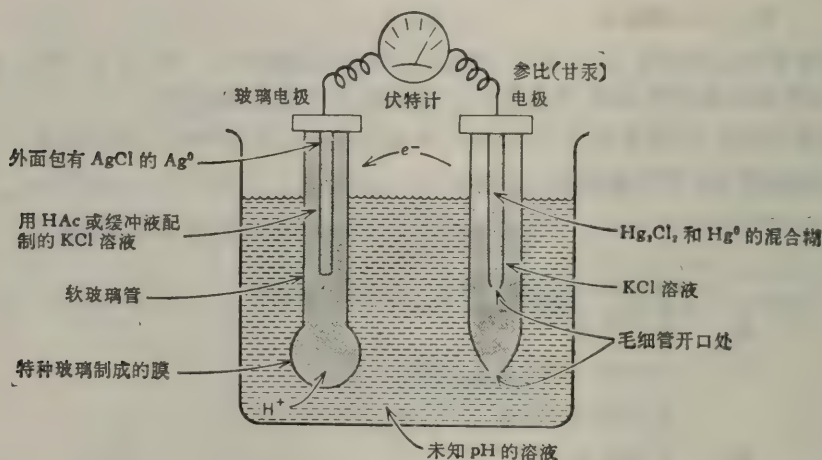


图 3-3 用于 pH 测定的玻璃电极。

玻璃电极是用一段软玻璃管制成的。在玻璃管的一端吹制一个可允许 H^+ 通透的薄玻璃泡。玻璃管内部装有用 HAc 或缓冲液配制的 KCl 溶液, 并插入一个标准电极, 如 Ag^0/AgCl 电极。溶液中的 Ag^+ 浓度由 AgCl 的 K_{sp} 所限定, Cl^- 离子浓度由 KCl 供应。溶液中的 H^+ 浓度则由缓冲液或弱电解质乙酸确定。 Ag^0/AgCl 电极相对于参比电极来说有其固定的电极势。但是在玻璃电极中还有另外一个电极势与 Ag^0/AgCl 电极的电极势相重合。这个电极势来自玻璃薄膜两侧 H^+ 离子浓度差。玻璃电极的电极势为: $E = E_0 + 0.059 \log[\text{H}^+]$ 。玻璃电极的 E_0 值不仅取决于 Ag^0/AgCl 电极的电极势, 也与电极内部缓冲液的 pH 值以及吹制膜的玻璃特性有关。总电池反应的 ΔE_0 值则决定于上述诸因素及参比电极的 E_0 值。由于玻璃电极没有固定的 E_0 值, 因此, 它不能用做 H^+ 离子浓度的绝对测量(如 $\frac{1}{2} \text{H}_2/\text{H}^+$ 电极那样)。玻璃电极必须定期用已知 pH 的缓冲液校正。

我们可以设想, 玻璃电极以下述方式进行工作: 如果将玻璃电极放到一个溶液中, 其 pH 值低于玻璃电极内部缓冲液的 pH 值, H^+ 离子将自外部溶液向薄玻璃膜内迁移。这进入膜内的 H^+ 离子又取代出玻璃膜内表面上的阳离子, 使后者进入内部溶液中(这些离子可能是从玻璃膜上取代下来的 Na^+ 、 K^+ 或 Ca^{++})。玻璃电极内部正电荷的暂时过剩, 引起电子

从参比电极向玻璃电极流动 ($2\text{Hg}^0 + 2\text{Cl}^- \longrightarrow \text{Hg}_2\text{Cl}_2 + 2e^- / 2\text{AgCl} + 2e^- \longrightarrow 2\text{Ag}^0 + 2\text{Cl}^-$). 如果外部溶液的 pH 值比玻璃电极内部的 pH 值高, 则 H^+ 离子将自玻璃电极迁出, 造成玻璃电极内部负电荷的暂时过剩. 于是, 电子将从玻璃电极流向参比电极 ($2\text{Ag}^0 + 2\text{Cl}^- \longrightarrow 2\text{AgCl} + 2e^- / \text{Hg}_2\text{Cl}_2 + 2e^- \longrightarrow 2\text{Hg}^0 + 2\text{Cl}^-$). 伏特计测定的电子电极势与玻璃膜两侧建立起的 H^+ 离子梯度成正比.

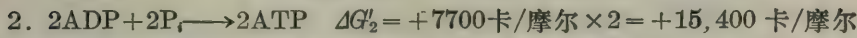
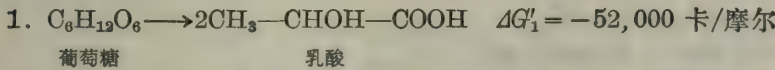
D. 新陈代谢与 ATP 的产生

例题 3-15

葡萄糖转变成乳酸, 总 $\Delta G'$ 为 $-52,000$ 卡/摩尔. 在厌氧细胞中, 此转变过程与 ATP 的合成相偶联. 每有一摩尔葡萄糖转变就有 2 摩尔 ATP 合成. (a) 计算总偶联反应的 $\Delta G'$. (b) 计算厌氧细胞中能量的保留效率. (c) 在需氧生物中葡萄糖完全氧化成 CO_2 和 H_2O ($\Delta G' = -686,000$ 卡/摩尔), 如果能量的保留效率相同, 每摩尔葡萄糖氧化时能得到多少摩尔的 ATP? (d) 计算与 ATP 合成相偶联的, 总氧化反应的 $\Delta G'$.

解:

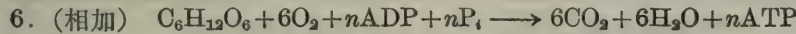
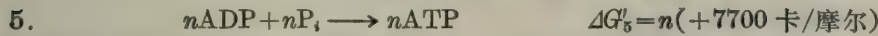
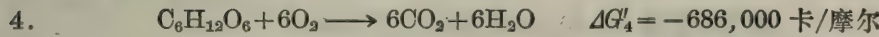
(a)



$$\Delta G'_3 = (-52,000) + (15,400) \quad \Delta G'_3 = -36,600 \text{ 卡/摩尔}$$

$$(b) \quad \text{效率} = \frac{\text{保留的能量}}{\text{可被利用的能量}} \times 100\% = \frac{15,400 \text{ 卡}}{52,000 \text{ 卡}} \times 100\% \\ \text{效率} = 29.6\%$$

(c)



效率为 29.6% 时, 被保留的能量为 $0.296 \times 686,000 \text{ 卡/摩尔} = 203,000 \text{ 卡/摩尔}$. 如果合成每摩尔 ATP 需 7700 卡, 则合成 ATP 的摩尔数为

$$\frac{203,000}{7700} = 26.4 \text{ 摩尔 ATP} = 26 \text{ 摩尔 ATP (最近似整数)}$$

(d) 总偶联反应

$$\Delta G'_6 = \Delta G'_4 + \Delta G'_5 = (-686,000) + 26(+7700) = (-686,000) + (200,200)$$

$$\Delta G'_6 = -485,800 \text{ 卡/摩尔}$$

需氧细胞的实际能量保留效率要比 29.6% 大. 每摩尔葡萄糖完全氧化可以产生 36 摩尔 ATP.

$$\text{每摩尔葡萄糖完全氧化时保留的能量} = 36 \text{ 摩尔} \times 7700 \text{ 卡/摩尔} = 277,200 \text{ 卡}$$

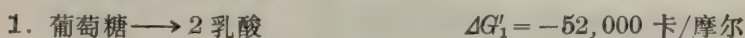
$$\frac{277,200}{686,000} \times 100 = 40.4\% \text{ 效率}$$

$$\Delta G'_6 = (-686,000) + (277,200)$$

$$\Delta G'_6 = -408,800 \text{ 卡/摩尔}$$

例题 3-16

(a) 根据下面给出的资料, 计算乳酸完全氧化成 CO_2 和 H_2O 时的 $\Delta G'$ 。(b) 若反应的效率为 40%, 能合成多少摩尔的 ATP?

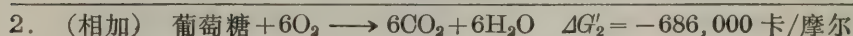
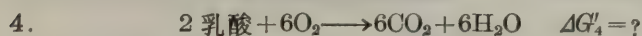


解:

(a) 我们所感兴趣的是下面的反应。



葡萄糖氧化成 CO_2 和 H_2O 的总反应可写成两步。



$\Delta G'_4$ 是很易计算的。

$$\Delta G'_2 = \Delta G'_1 + \Delta G'_4$$

$$-686,000 = -52,000 + \Delta G'_4$$

$$\Delta G'_4 = -686,000 + 52,000 = -634,000 \text{ 卡}$$

每氧化 2 摩尔乳酸产生 634,000 卡能量, 因此, 氧化 1 摩尔乳酸产生的能量将是上面数值的一半。

反应 3 产生的能量是反应 4 的一半。

$$\therefore \Delta G'_3 = \frac{-634,000}{2} = -317,000 \text{ 卡/摩尔乳酸}$$

(b) 效率为 40% 时,

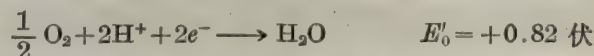
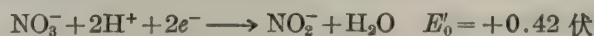
$$\text{保留的能量} = 0.40 \times 317,000 = 127,000 \text{ 卡}$$

每合成 1 摩尔 ATP 需要 7700 卡能量。

$$\text{合成 ATP 的摩尔数} = \frac{127,000}{7700} = \sim 16 \text{ 摩尔 ATP}$$

例题 3-17

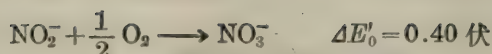
(a) 固氮菌 (*Nitrobacter agilis*) 在自然界的氮循环中起着重要的作用, 因其在有氧时能将土壤中的亚硝酸氧化成硝酸。有关的 E'_0 值给定如下, 计算每摩尔亚硝酸氧化时产生的 ATP 潜能, 假设效率为 5%。



(b) 许多兼性微生物在厌氧条件下可利用 NO_3^- 做为末端电子接受体 (氧化剂)。试比较每摩尔 NADH 为 O_2 氧化和为 NO_3^- 氧化时产生的 ATP。假定能量的保留效率为 50%。NAD⁺/NADH 电极反应的 E'_0 值为 -0.32 伏。其它有关的 E'_0 值已在 (a) 部分中给出。

解:

(a) 总反应为



$$\Delta G' = -(2)(23,063)(0.40) = -18,450 \text{ 卡/摩尔}$$

$$\text{产量} = \frac{(18,450)(0.50)}{(7700)} = 1.19 \text{ 或 } \sim 1\text{ATP}/\text{NO}_2^- \text{ 氧化}$$

(b) 当 NO_3^- 为末端电子受体时, 偶联反应为



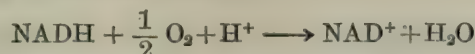
$$\Delta E'_0 = (0.42) - (-0.32) = 0.42 + 0.32 = 0.74$$

$$\Delta G' = -(2)(23,063)(0.74) = -34,133 \text{ 卡/摩尔}$$

在能量保留效率为 50% 时,

$$\text{产量} = \frac{(34,133)(0.5)}{(7700)} = 2.2 \text{ 或 } \sim 2\text{ATP}/\text{NO}_3^- \text{ 还原}$$

当 O_2 为末端电子受体时, 总反应为



$$\Delta E'_0 = (0.82) - (-0.32) = 0.82 + 0.32 = 1.14 \text{ 伏}$$

$$\Delta G' = -(2)(23,063)(1.14) = -52,584 \text{ 卡/摩尔}$$

$$\text{产量} = \frac{(52,584)(0.5)}{(7700)} = 3.4 \text{ 或 } \sim 3\text{ATP}/\text{O}_2 \text{ 还原}$$

一般原理

某电极反应究竟是氧化还是还原取决于与其相偶联的电极反应的 E 值。因之, 有些生物可以氧化 NO_2^- 以获取能量, 如果含有较 NO_3^- 为强的氧化剂。另一些生物通过氧化某化合物, 即氧化较 NO_2^- 为强的还原剂, 以还原 NO_3^- (而且在此过程中获取能量)。电极反应的氧化或还原全是相对的。

	NAD^+/NADH	$E'_0 = -0.32 \text{ 伏}$	} 在 b 部分: NADH 被氧化 NO ₃ ⁻ 被还原
在 a 部分:	$\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$	$E'_0 = +0.42 \text{ 伏}$	
NO ₂ ⁻ 被氧化 O ₂ 被还原	$\frac{1}{2} \text{O} / \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$	$E'_0 = +0.82 \text{ 伏}$	

例题 3-18

(a) 计算 1 摩尔软脂酸经 β 氧化, 三羧酸循环和电子传递系统完全氧化成 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ 时, 所得的 ATP 的摩尔数。(b) 长链脂肪酸完全氧化, $\Delta G'$ 约为 9000 卡/克。软脂酸在进行生物氧化时, 总 $\Delta G'$ 中以 ATP 形式保留的能量百分数是多少?

解:

(a) 变化途径和 ATP 的生成见图 3-4。

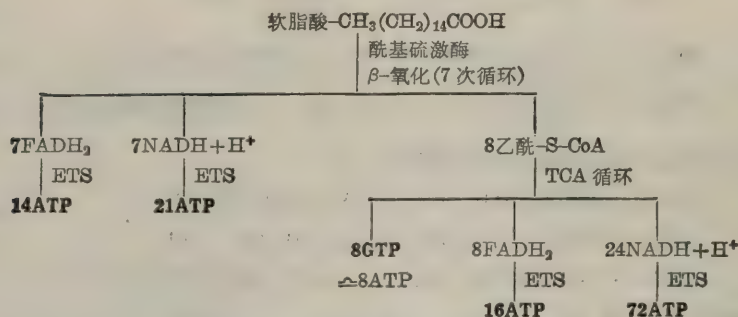
(b) 每有 1 摩尔软脂酸氧化, 即可生成 130 摩尔 ATP。软脂酸的分子量为 256.4。

$$\therefore \text{软脂酸氧化时的 } \Delta G' = (256.4)(9000) = 2.31 \times 10^6 \text{ 卡/摩尔}$$

130 摩尔 ATP 保留的能量约为

$$(130)(7700) = 1 \times 10^6 \text{ 卡}$$

$$\text{效率} = \frac{(1.0 \times 10^6)(100)}{(2.31 \times 10^6)} = 43.3\%$$



净结果 $131-1(\text{酰基硫激酶}) = 130\text{ATP}/\text{软脂酸}$

图 3-4 软脂酸完全氧化时生成的 ATP。

例题 3-19

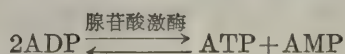
在淋巴肉瘤细胞的培养基中，腺苷酸代谢库由 $10^{-3}M\text{ATP}$ ， $3 \times 10^{-4}M\text{ADP}$ 和 $10^{-4}M\text{AMP}$ 组成。(a) 计算淋巴肉瘤细胞的“能贮”(energy charge)。(b) 假定各种腺苷酸已处于腺苷酸激酶所催化反应的平衡状态，计算反应的 $K'_{\text{平}}$ 。

解：

(a) “能贮”的定义是

$$\text{能贮} = \frac{[\text{ATP}] + \frac{1}{2}[\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]} \quad (39)$$

这就是说“能贮”乃是 ATP 或其等效物质占总腺苷酸代谢库的摩尔分数。由于腺苷酸激酶催化下列反应：



故 $[\text{ADP}]$ 等效于 $[\text{ATP}]$ 的一半* (若 $2\text{ADP} \rightleftharpoons 1\text{ATP}$ ，则 $1\text{ADP} \rightleftharpoons \frac{1}{2}\text{ATP}$)。

$$\begin{aligned} \therefore \text{能贮} &= \frac{(10^{-3}) + \frac{1}{2}(3 \times 10^{-4})}{(10^{-3}) + (3 \times 10^{-4}) + (10^{-4})} = \frac{(10^{-3}) + (1.5 \times 10^{-4})}{(10^{-3}) + (3 \times 10^{-4}) + (10^{-4})} \\ &= \frac{1.15 \times 10^{-3}}{1.4 \times 10^{-3}} \quad \text{能贮} = 0.82 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} (b) \quad K'_{\text{平}} &= \frac{[\text{ATP}][\text{AMP}]}{[\text{ADP}]^2} = \frac{(10^{-3})(10^{-4})}{(3 \times 10^{-4})^2} = \frac{10^{-7}}{9 \times 10^{-8}} \\ &= \frac{10 \times 10^{-8}}{9 \times 10^{-8}} \quad K'_{\text{平}} = 1.11 \end{aligned}$$

氧化磷酸化和化学渗透假说

人们曾提出过不少假说以解释线粒体或细菌细胞膜中电子的传递是如何与 ATP 的

* 原书误写为 $\frac{1}{2}$ 的 $[\text{ADP}]$ 等效于 $[\text{ATP}]$ ——译者注。

形成相偶联。化学偶联假说认为：氧化磷酸化基本上等于底物水平的磷酸化作用。即，在这个过程中包含有严谨的高能中间物。机械化学模型或构象偶联模型认为：细胞膜内的氧化-还原反应导致细胞膜或细胞膜内的某些亚单位处于充能的构象状态。这一情况有如给发条上弦。这充有能量的膜所贮存的机械能，在形成 ATP 时，不知道怎样被消耗掉了。化学渗透假说则认为：电子载体是不对称地定位在膜内的。因而，在产生 H^+ 离子时， H^+ 离子只能从膜的一侧释放（内膜的外侧）。在利用 H^+ 离子时， H^+ 离子则从膜的另一侧获得（内膜的内侧）[图 3-5(a)]。这样，在 $2e^-$ 流经电子传递系统时，便在内膜两侧产生了 ΔpH 。由 ATP 酶反向催化的 $ADP + P_i$ 脱水而合成 ATP 的反应，其推动力就是这个 ΔpH 。图 3-5(b) 给出

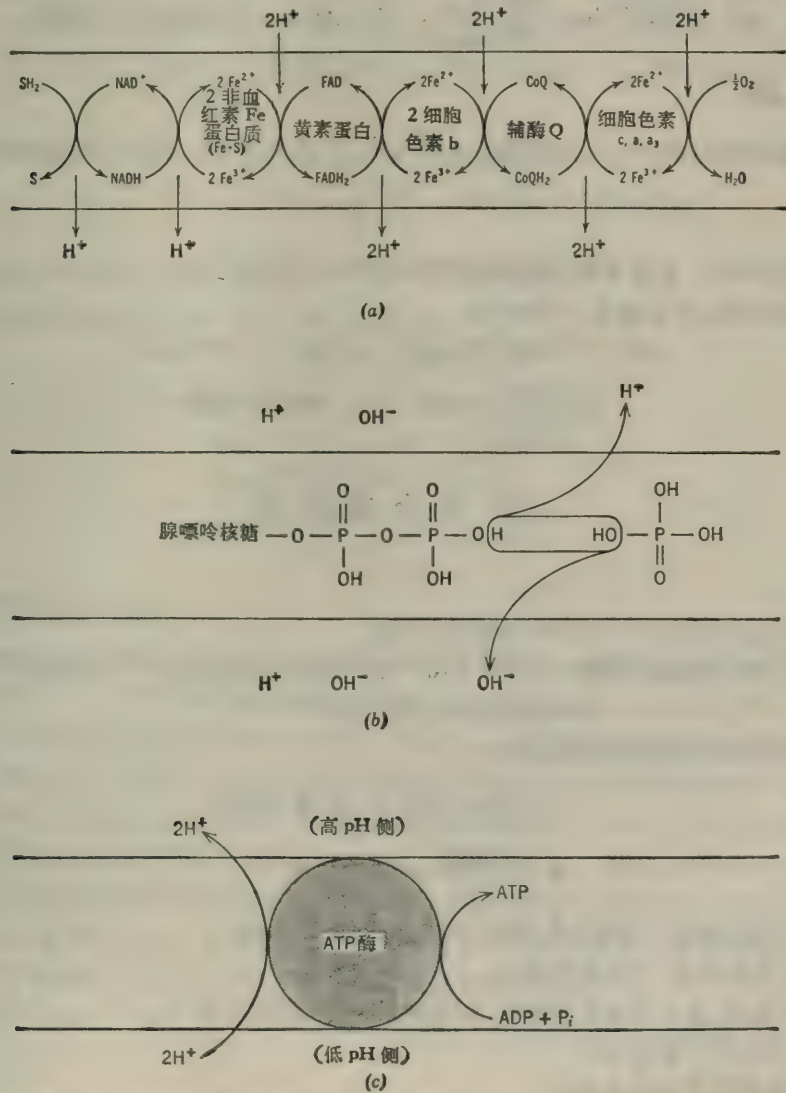
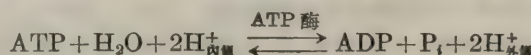


图 3-5 (a) 当 $2e^-$ 沿电子传递系统移动时，不对称地释放和吸收 H^+ ，并在膜两侧产生 ΔpH 。(b) 由膜 ATP 酶所催化的自 $ADP + P_i$ 合成 ATP。ATP 酶移走水的成分， H^+ 向一个方向移动（进入 pH 高的区域）； OH^- 向另一个方向移动（进入 pH 低的区域）。(c) 膜 ATP 酶催化合成 ATP 的更确切的模型，ATP 的合成与二个 H^+ 离子的移位紧密地偶联在一起。

的是一个简单的模型。图中假设移走的不是水本身，而是构成水的离子(H^+ 和 OH^-)。 H^+ 被拉向内膜 pH 高(H^+ 不足)的一侧; OH^- 被拉向内膜 pH 低(H^+ 过剩)的一侧。图 3-5(o) 代表一个更为恰当模型。这个模型假设，ATP 酶所催化的反应与 H^+ 离子的运动不可分割地偶联在一起。试验证据指出，ATP 酶催化的反应为



因之，ATP 的合成是与 $2H^+$ 从膜的低 pH 侧向膜的高 pH 侧的移动相偶联的。在下节中已经指出， $2H^+$ 在移动时的 ΔG 为

$$\Delta G = 2.3RT \log \frac{[H^+]_{\text{高pH侧}}^2}{[H^+]_{\text{低pH侧}}^2} \quad \text{或} \quad \Delta G = -(2.3RT)(2) \Delta pH \quad (40)$$

例题 3-20

在 25°C 及标准状态条件下，计算推动 $ADP + P_i$ 合成 ATP 时，线粒体内膜两侧所需要的 ΔpH 。

解：

在标准状态条件下，合成 ATP 所需的能量为 7700 卡/摩尔。因此，为使 $2H^+$ 穿过膜移动，由 ΔpH 所提供的 ΔG 必须是 -7700 卡。

$$\begin{aligned} \Delta G &= -(1364)(2) \Delta pH - 7700 = -2728 \Delta pH \\ \frac{-7700}{-2728} &= \Delta pH \quad \Delta pH = 2.82 \end{aligned}$$

E. 光合磷酸化

光的能量

每一个光子或光量子具有 $h\nu$ 的能量，在此，

$$h = \text{Planck 常数} = 6.627 \times 10^{-27} \text{ 尔格} \times \text{秒} = 1.58 \times 10^{-34} \text{ 卡} \times \text{秒}$$

而

$$\nu = \text{光的频率, 单位为秒}^{-1}$$

1 爱因斯坦(1 摩尔)光子具有的能量为

$$\mathcal{E} = Nh\nu = Nh \frac{c}{\lambda} \text{ 卡/爱因斯坦} \quad (41)$$

或

$$\mathcal{E} = \frac{2.855}{\lambda} \text{ 卡/爱因斯坦}$$

式中， N = 阿伏加德罗常数 = 6.023×10^{23} 光子/爱因斯坦，

λ = 光的波长，以厘米为单位，

c = 光速，如 λ 的单位为厘米，则光速的单位为厘米/秒

$$= 3 \times 10^{10} \text{ 厘米/秒。}$$

因而，光的能量与其波长成反比。

例题 3-21

计算每爱因斯坦光子的能量。当光的波长为(a)400nm(紫色)，(b)600nm(橙色)。

解:

$$(a) \quad 1\text{nm} = 10^{-9} \text{ 米} = 10^{-7} \text{ 厘米} \quad \therefore 400\text{nm} = 4 \times 10^{-5} \text{ 厘米} = \lambda$$

$$\mathcal{E} = \frac{2.855}{4 \times 10^{-5}} = 71,375 \text{ 卡/爱因斯坦}$$

$$(b) \quad \mathcal{E} = \frac{2.855}{6 \times 10^{-5}} = 47,582 \text{ 卡/爱因斯坦}$$

例题 3-22

(a) 某光合的生物体吸收 1 爱因斯坦波长为 700nm 的红光, 若能量转化效率为 100%, 能合成 ATP 多少摩尔? (b) 若吸收 1 个光子的红光, 能合成 ATP 多少分子? (c) 用红光激发时, 若每 2 个当量电子 (即每 2 个爱因斯坦光子) 产生 1 摩尔 ATP, 能量转化的总效率是多少?

解:

$$(a) \quad \mathcal{E} = \frac{2.855}{\lambda} = \frac{2.855}{7 \times 10^{-5}} = 40,786 \text{ 卡/爱因斯坦}$$

$$\frac{40,786}{7700} = 5 \text{ 摩尔 ATP/爱因斯坦}$$

(b) 光子/爱因斯坦的比值等于分子/摩尔的比值.

$$\therefore 5 \text{ 分子 ATP/光子}$$

(c) 假定将二个电子激发到足够高的能级必须吸收两个光子, 则

$$\mathcal{E}_{\text{输入}} = (2)(40,786) = 81,572 \text{ 卡}$$

$$\mathcal{E}_{\text{输出}} = (1)(7700) = 7700 \text{ 卡}$$

$$\text{效率} = \frac{7700}{81,572} \times 100 = 9.4\%$$

非循环和循环光合磷酸化

绿色植物具有两类明显不同的色素系统(PSI 和 PSII), 这两类色素系统提供了非循环的电子流(图 3-6)。由 PSI 所吸收的光, 激发电子到一定的能级, 足以通过 FRS (一种能使铁氧还素还原的物质) 还原的铁氧还素(ferrodoxin)。被还原的铁氧还素随即将电子传递给 NADP 使变成 NADPH, 后者供光合作用的暗反应(CO₂ 的还原反应)中使用。氧化态 PSI 再从 PS II 处接受电子而还原。这些电子是激发到具有 0—0.2 伏的还原电极势的。当这些电子传递给氧化态 PSI 时, 就产生了一个或更多的 ATP。氧化态 PS II 又为水中的电子还原(在还原过程中导致氧的释放)。H₂O 是一个足以使氧化态 PS II 还原的还原剂, 但它不能使氧化态 PSI 还原。人们认为来自 PSI 的电子还可以通过一条循环的途径来合成 ATP, 而不需要同时合成 NADPH。图 3-6 绘制的是各家说法中的一种。其电子传递反应的确切顺序尚不清楚。事实上, 就连某些载体的确切标准还原电极势也知道得不确实。

例题 3-23

假设图 3-6 中所示的序列和各种物质的还原电极势都是正确的。(a) 计算经过一次非循环过程产生的 NADPH/ATP/O₂ 比值。(b) 计算经过一次循环过程产生的 ATP。(c) 计算由 6CO₂ + 6H₂O 合成 1 摩尔葡萄糖时, 红光(λ = 700 nm) 的能量转化效率。假设每经一

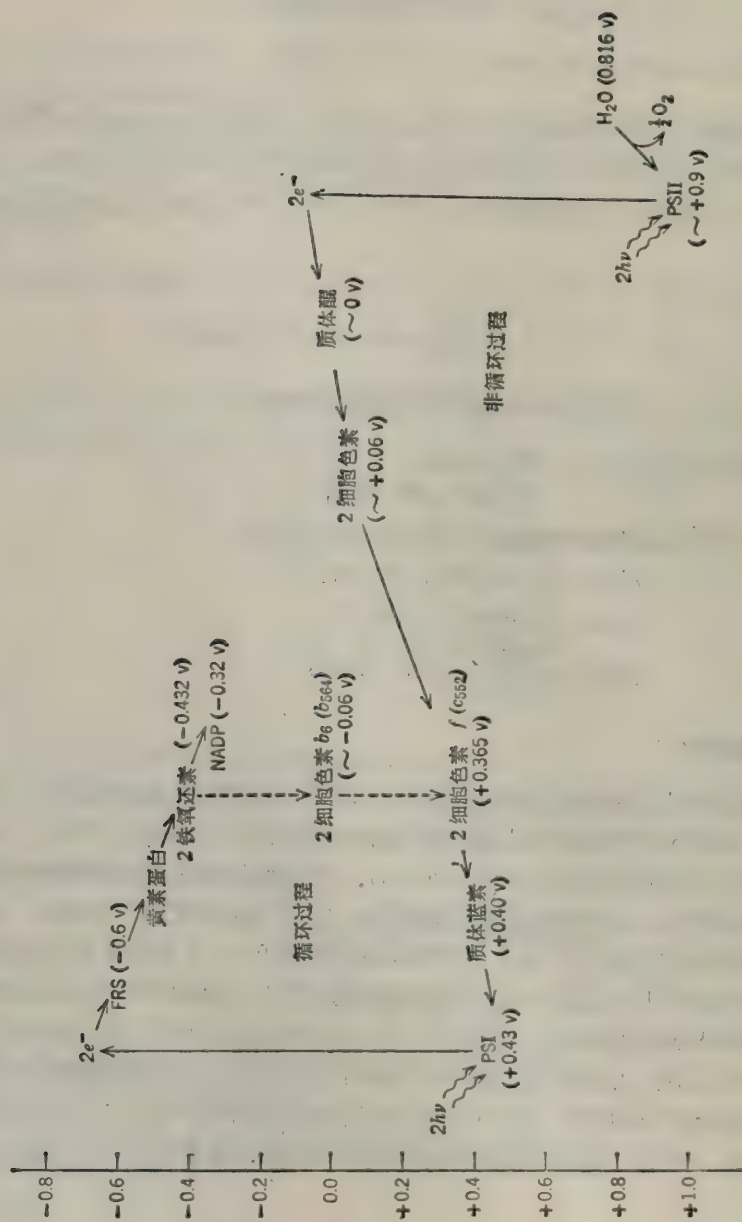


图 3-6 绿色植物的非循环和循环光合磷酸化作用。色素系统 I (PS I) 含有叶绿素 a, P-700 (在 700nm 处具有最大吸收的一种色素) 和胡萝卜素, 色素系统 II (PS II) 含有叶绿素 a, b, c 和 d 及藻胆色素。

次非循环过程 ($4e^-$)* 产生 1ATP 和 1NADPH; 每经一次循环过程 ($2e^-$) 产生 1ATP. (d) 如果每经一次非循环过程产生 2ATP+1NADPH, 能量的转化效率应是多少?

解:

(a) 在标准状态条件下和能量转化效率为 100% 时, 合成 ATP 所需的能量为 7700 卡/摩尔. 此数值的能量相当于一 $\Delta E'_0$ 为 0.167 伏的 $2e^-$ 氧化-还原反应, 如下所示:

$$\Delta G' = -n\mathcal{F}\Delta E'_0 \quad \text{或} \quad \Delta E'_0 = \frac{\Delta G'}{-n\mathcal{F}}$$

$$\Delta E'_0 = \frac{-7700}{-(2)(23,063)} = 0.167$$

在合理的转化效率为 50% 时, 需要的 $\Delta E'_0$ 为 0.334. 在图 3-6 所给出的非循环过程的序列中, 只有一个氧化-还原偶可提供 0.33 或更高的 $\Delta E'_0$ ——它位于细胞色素 b_{559} 和细胞色素 f 之间. 因此, 每激发 $4e^-$ (由 4 个光子激发), 即可得到

$$1\text{NADPH}:1\text{ATP}:\frac{1}{2}\text{O}_2$$

(b) 循环途径看来颇不完善. 电子的传递不象是从铁氧还素直接传给细胞色素 b_6 , 随后再从细胞色素 b_6 直接传给细胞色素 f. 这些反应的 $\Delta E'_0$ 值与其它的电子传递反应相比要大得多. 事实上, 这些反应中的每一步只要进行 $1e^-$ 传递, 其 $\Delta G'$ 都足以合成一个 ATP. 因之, 如图 3-6 所示, 在循环过程中存在的电势能使每 $2e^-$ 传递时合成 4 个 ATP.

从另一个角度来推理, 我们也可能得出在循环过程中不能形成 ATP 的结论. 因为, 在电子由铁氧还素向细胞色素 f 传递时, 根本没有可接受或释放 H^+ 的载体, 当然也就无法产生 ΔpH . 那么, 似乎可能还有其它的载体(如黄素蛋白, 醌类等)参与作用.

(c) 由 $6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$ 合成一个葡萄糖需要 18ATP+12NADPH. 根据前面 NADPH 和 ATP 产生的假设, 需要有 12 次非循环过程(产生 $\simeq 12\text{ATP} + 12\text{NADPH}$), 再加上 6 次循环过程(产生 $\simeq 6\text{ATP}$). 如果每次非循环过程需要输入 4 个光子, 而每次循环过程需要输入 2 个光子, 那么, 要产生 18 摩尔 ATP 和 12 摩尔 NADPH, 就需要 $48 + 12 = 60$ 个爱因斯坦的红光.

$$\mathcal{E} = \frac{2.855}{\lambda} = \frac{2.855}{7 \times 10^{-5}} = 40,785 \text{ 卡/爱因斯坦}$$

$$\text{输入能量} = (40,785)(60) = 24.47 \times 10^5 \text{ 卡}$$

由 6 摩尔 CO_2 和 6 摩尔 H_2O 形成 1 摩尔葡萄糖时, $\Delta G'$ 为 +686,000 卡/摩尔.

$$\therefore \text{效率} = \frac{68.6 \times 10^4}{24.47 \times 10^5} \times 100 = 28\%$$

(d) 如果每次非循环过程产生 2ATP+1NADPH, 那么, 只要单独进行 12 次非循环过程 (48 个光子), 就可以产生足够的 NADPH, 而且 ATP 有过剩. 能量转化效率将会提高.

$$\text{效率} = \frac{(68.6 \times 10^4)(100)}{(48)(40,785)} = 35\%$$

例题 3-24

绿硫细菌属的光合细菌含有单一的色素系统, 但是它们在有 H_2S 存在时, 可以进行非循环

* 此处的“ $4e^-$ ”和“ $2e^-$ ”, 我们认为改做“ $4h\nu$ ”和“ $2h\nu$ ”较合适. 因为每经一次非循环过程和一次循环过程, 传递的电子数目都是 2 个. 但是每一次非循环过程需要的光量子数是 4 个 (2 个电子被激发两次); 每一次循环过程需要的光量子数是 2 个 (2 个电子被激发一次)——译者注.

光合磷酸化作用 ($S^0 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2S$ 电极反应的 E'_0 为 -0.23 伏)。在红光下 ($\lambda = 700\text{ nm}$)，绿硫细菌可还原人工电子受体甲基紫原 ($E'_0 = -0.55$ 伏)。该生物体至少含有两种不同的细胞色素，其中之一系与黄素蛋白结合在一起。绘制一大体上反映出总光合磷酸化过程的轮廓图，其中包括有天然电子载体，并估计各种产物的相对产量和比值。假定原初(光)电子受体还原时的能量保留效率为 60% ，而 H_2S 氧化形成 ATP 时的能量保留效率为 50% 。

解：

图 3-7 所示的总过程是根据下列几点考虑绘制的。(a) 为了使用基紫原还原，来自色素系统的电子其还原电极势必须较 -0.55 伏更负。大体估计为 -0.60 伏，此数值足以还原象铁氧还素这样的天然电子受体，并依次使 $NADP^+$ 还原。(b) 2 爱因斯坦波长为 700 nm 的光含有 $81,572$ 卡的能量。如果原初电子受体还原时保留了 60% 的能量，那么， $\Delta G' = -48,943$ 卡/2 当量。此数值相当于 $\Delta E'_0$ 为 1.061 伏。因此，未被激发的色素系统的 E'_0 为 $+0.461$ 伏。(c) H_2S 能还原氧化态的色素系统。总反应的 $\Delta E'_0$ 是 0.691 伏，它相当于 $\Delta G'$ 为 $-31,873$ 卡/摩尔。这个能量若保留 50% ，则为 $15,937$ 卡，足够形成 2 个 ATP。不了解载体的 E'_0 值，偶联的确切位置是无法推测的。总反应过程的产物为 $1NADPH$ ， $2ATP$ 和 1 自由硫。这个 $2ATP:1NADPH$ 比值较 CO_2 还原时为高。注意，绿硫细菌不需要有第二个色

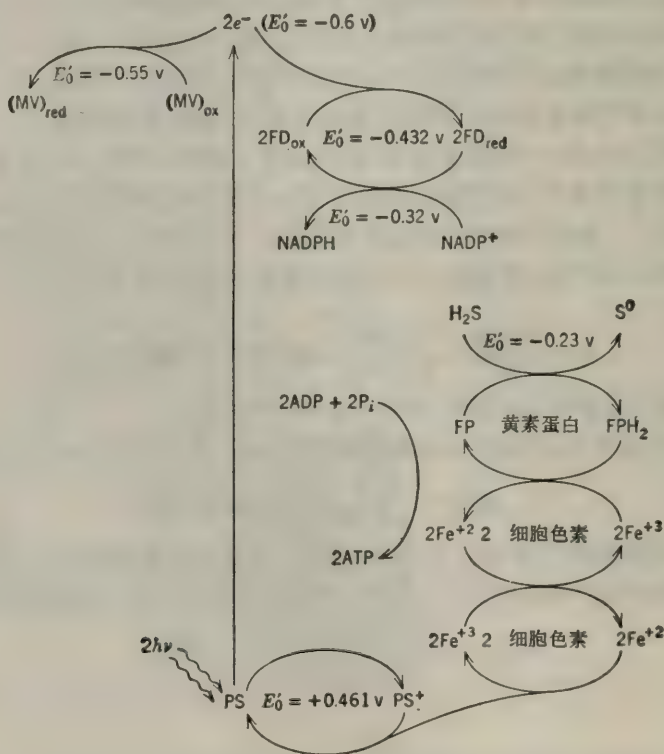


图 3-7 在有 H_2S 存在时，绿硫细菌的非循环光合磷酸化作用。缩写符号 (MV)_{red}: 还原态甲基紫原, (MV)_{ox}: 氧化态甲基紫原, FD_{ox} : 氧化态铁氧还素, FD_{red} : 还原态铁氧还素, $NADP^+$: 氧化态烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸, $NADPH$: 还原态烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸, PS : 还原态色素系统, PS^+ : 氧化态色素系统。

素系统, 因为 H_2S 的还原电极势比色素系统的还原电极势更负。绿色植物需要有 PS II, 因为水不能还原氧化态的 PS I (但是水能还原氧化态的 PS II)。

F. 主动转运

一个不带电荷的分子, 从膜的一侧 (浓度为 C_1) 向膜的另一侧 (浓度为 C_2) 移动时所引起的标准自由能变化, 可用下面的通式来表示:

$$\Delta G = -2.3RT \log K'_{\text{eq}} + 2.3RT \log \frac{C_2}{C_1} \quad (42)$$

简单扩散过程的 K'_{eq} 值为 1。即, 当扩散平衡时, 膜两侧溶质的浓度相等。因此, 在非平衡状态下, 溶质从第一侧向第二侧移动时所引起的 ΔG 变化可以写成

$$\Delta G = 2.3RT \log \frac{C_2}{C_1} \quad (43)$$

(43) 式表示的是稀释自由能或浓缩自由能, 即, 在两种不同浓度下溶质的化学势之差。如果 C_1 大于 C_2 , 则 ΔG 为负值。这表明溶质分子将自发地由浓度为 C_1 的区域向浓度为 C_2 的区域移动 (我们不需任何公式即可直觉地得出这一结论)。活细胞有反抗高浓度梯度而转运和聚积某些化合物的能力。这种转运过程的 ΔG 显然是正值, 因此, 必须供给能量。这就是说, 这种使能量增加的分子转运必须以某种方式与某一放能反应相偶联, 才能使总的 ΔG 为零或为负值。能量偶联的机制 (转运机制本身也是一样) 是集中研究的课题。大多数的转运过程是通过具有类似于酶作用的特殊的膜载体进行中间传递的。我们常用透性酶 (permease) 这个名词表示这样的膜转运系统。很可能, 转运系统的某种蛋白质在膜的外侧与底物结合。这种结合复合物然后经过构象变化, 导致底物在膜的内侧释放 (图 3-8)。如果转运系统仅仅平衡了外侧和内侧底物, 该过程就是简化的扩散过程——不存在对抗浓度梯度 ($\Delta G=0$), 但是, 仍是载体中间传递和类似酶作用的过程。如果转运系统对抗梯度而促进底物的聚积, 该过程就叫做主动转运, 并且需要输入能量。这输入的能量可用于使载体-底物复合物向内部移位; 使未负荷的载体向外部移位; 或是在胞质-膜的界面处降低载体对底物的亲合力; 或是在膜的外表面处增加载体对底物的亲合力。在有些生物体中, 主动转运所需的能量可直接由 ATP 供应。载体的磷酸化促进了底物的结合, 或释放或移位。在另一些生物体中 (或同一生物体内的其它转运系统中), 膜内的能量产生反应产生了电化学电势, 此电势则起了推动力的作用。例如, 在动物细胞中有一种膜 ATP 酶, 每水解一个 ATP, 就促使了 Na^+ 离子向膜外移动, 和 2K^+ 离子向膜内移动。其结果同时导致高 $[\text{Na}^+]_{\text{外}}/[\text{Na}^+]_{\text{内}}$ 比值和叠加了电荷梯度 (膜内部相对于膜外部来说为负)。 Na^+ 向膜内转运时所需的 ΔG (等于浓度梯度和电荷梯度所能提供的能量) 为

$$\Delta G = 2.3RT \log \frac{C_2}{C_1} + z\mathcal{F}\Delta\psi \quad (44)$$

式中, C_2/C_1 = 带电分子 (Na^+) 内部/外部浓度比,

z = 分子上的净电荷 (对 Na^+ 来说为 +1),

$\Delta\psi$ = 以伏特为单位的膜电势 (膜内部相对于膜外部的电势)。

$z\mathcal{F}\Delta\psi$ 项与氧化-还原反应中的 $n\mathcal{F}\Delta E$ 相似 (如果 ATP 酶促使 K^+ 和 Na^+ 一对一的交换, 则只能形成浓度梯度, 而 $\Delta\psi=0$)。 Na^+ 离子是由与 Na^+ 有高度亲合力的膜蛋白携带向内

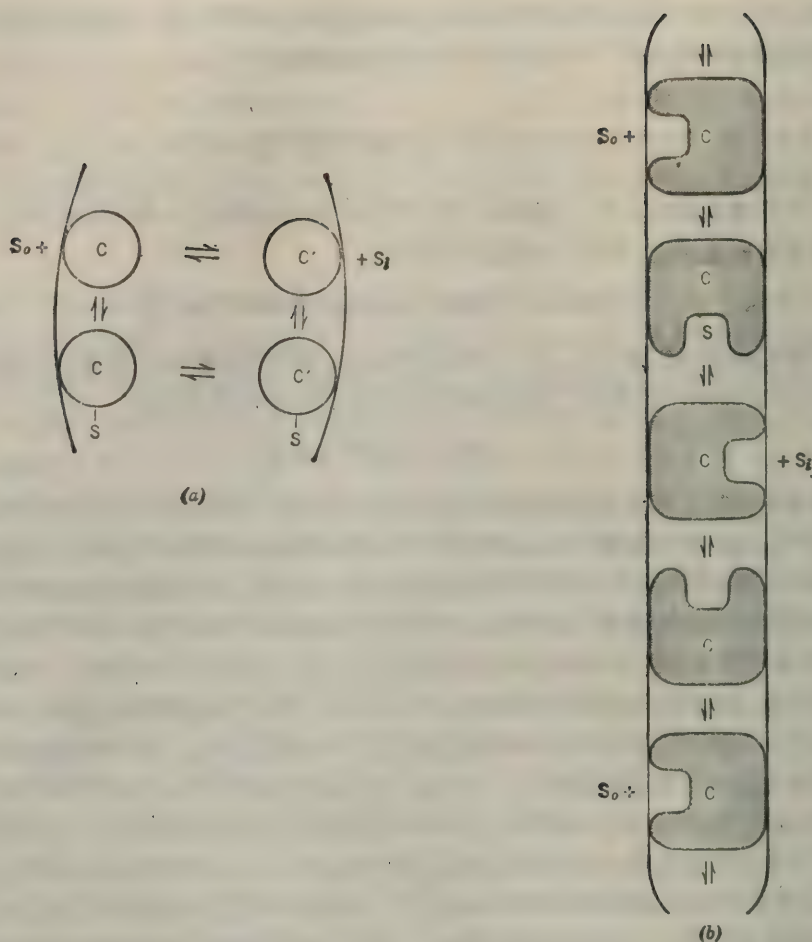


图 3-8 载体-中间转运。C 是一种对 S 有高度亲合力的特殊膜蛋白。载体-底物复合物在膜的外表面上形成, 然后 (a) 扩散通过膜, 或 (b) 经过构象的变化, 将结合的底物带到膜的内表面, 并在这里释放底物。

部移动的(使电化学梯度降低)。如果这个膜蛋白对丙氨酸, 比如说, 也有高度亲合力, 它也同时中间转运丙氨酸。丙氨酸在膜内聚积的限度为进一步转运丙氨酸时的 ΔG (为正值) 与转运 Na^+ 时的 ΔG (为负值) 相等。这在某种意义上相当于一个吸能反应(丙氨酸转运能量增高) 已与一个放能反应 (Na^+ 转运能量降低) 偶联在一起, 其结果使这两个反应加合的总 ΔG 为 0。同样的情况, 高 $[\text{K}^+]_{\text{in}}/[\text{K}^+]_{\text{out}}$ 比值可用来将物质转运到细胞外部。应当记住, 积极进行代谢的细胞是处于稳态的。ATP 随用掉随产生。因此, 溶质的转运和聚积并不使膜电势消失。因为每有一个 Na^+ 向膜内部移动(与其共转运底物一道), 就有一个 Na^+ (消耗 ATP) 向膜外部移动。

例题 3-25

血清中氯离子浓度约为 $0.10M$ 。尿中氯离子浓度约为 $0.16M$ 。(a) 计算肾脏将氯离子从血浆转运到尿时所消耗的能量。(b) 每摩尔 ATP 水解时能转运多少 Cl^- 离子?

解:

$$(a) \quad \Delta G = 1364 \log \frac{0.16}{0.10} = 1364(0.204)$$

$$\Delta G = 278 \text{ 卡/摩尔}$$

(b) ATP 水解时给出能量 7700 卡/摩尔.

$$\frac{7700}{278} = 27.7 \quad \therefore \sim 28 \text{ Cl}^-/\text{ATP}$$

例题 3-26

在大肠杆菌中, 细胞膜内的氧化-还原反应 (或 ATP 水解) 产生的 $\Delta p\text{H}$ 为 1 (内部 pH 比外部高 1 个单位), $\Delta\psi$ 为 -120 毫伏 (内部为负). 在总“质子动力”的推动下, β -半乳糖苷随同 H^+ 离子共同转运. 问 (a) $\Delta p\text{H}$ 和 $\Delta\psi$ 可提供多少能量? (b) 大肠杆菌能聚积 β -半乳糖苷到何种浓度梯度?

解:

(a) $\Delta p\text{H}$ 为 1 即相当于 $[\text{H}^+]_{\text{内}}/[\text{H}^+]_{\text{外}}$ 比值为 1:10.

$$\Delta G = 1364 \log 0.1 + (1)(23,063)(-0.120) = -1364 - 2768$$

$$\Delta G = -4132 \text{ 卡/摩尔}$$

因而, β -半乳糖苷的转运是与一供能 4132 卡/摩尔的放能系统相偶联的.

(b) 当 ΔG 为 +4132 卡/摩尔时, 内部 β -半乳糖苷/外部 β -半乳糖苷的比值最大. 在此比值下, 总偶联系统将处于平衡状态 ($\Delta G_{\text{总}} = 0$).

$$\Delta G = 1364 \log \frac{C_2}{C_1} = 4132 \text{ 卡/摩尔}$$

$$\log \frac{C_2}{C_1} = \frac{4132}{1364} = 3.03$$

$$\frac{C_2}{C_1} \approx 1000$$

G. 焓 和 熵

ΔH 和 ΔS

假定在 25°C 和标准状态下有一摩尔 ATP 水解, 其 $\Delta G' = -7700$ 卡/摩尔. 该水解反应没有同任何基团转移反应偶联. 这是不是意味着 ΔG 的全部能量皆表现为热的形式? 热力学第一定律和第二定律联系反应的 ΔG 与放出热量间的关系式为

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (45)$$

ΔH 称做焓的变化, 用以表示一反应系统在恒温、恒压和恒容时放出 (或吸收) 的热量. ΔS 为熵的变化, 是用以度量系统的无规性变化的. 如果我们测量或计算 ATP 水解时的 ΔH , 所得的数值约为 -4000 卡/摩尔. 剩余的 3700 卡/摩尔能量不是以热的形式放出, 而是以增加无规运动的形式为产物所保留 ($T\Delta S = +3700$ 卡/摩尔). (45) 式也可以写成

$$\Delta H = \Delta G + T\Delta S \quad (46)$$

(46) 式说明, 若向一个系统中加入一定的热量 (ΔH 为正), 如果 ΔS 为正值, 则只有一部分输

入热量能用来对系统做有用功, $T\Delta S$ 项所代表的是那部分不能变做有用功的输入热量。

ΔH 的符号并不能指出反应的自发方向。从(45)式我们看到, 即使 ΔH 为正值, 如果 ΔS 很正的话, ΔG 也仍可为负值。例如, 如果我们将某固体状态的盐与水混合, 可观察到盐溶解时温度显著地降低, 说明了热量已被吸收。这个过程的 ΔH 为正值(为了保持系统的温度恒定必须加入热量)。因为盐是自发地溶解, 所以 ΔG 是负值。 $T\Delta S$ 项也是正值——盐离子原来是在高度有序的晶体排列中, 现在是无规地分布在溶液中。

液体在温度低于冰点(FP)时的冻结是某反应过程 ΔH 为负值(放出热量), ΔG 为负值(冻结是自发过程——在温度低于 FP 时, 固体比液体更稳定), 而且 $T\Delta S$ 也是负值(液体分子变得象固体那样有更高度的秩序)的一个例子。可见, 只有知道了 $T\Delta S$, 我们才能根据 ΔH 推测 ΔG 的符号, 或根据 ΔG 推测 ΔH 的符号(除非 ΔG 或 ΔH 之一为零)。同理, 我们也不能单独地根据 ΔH 或 ΔG 推测 ΔS 的符号, 除非其中之一为零。举例来说, 在 0°C 时, 固体冰与液体水处于平衡状态, 故 $\Delta G=0$ 。液体水 \rightarrow 固体冰这个反应的 ΔH 为负值(-80 卡/克或 -1440 卡/摩尔)。因此, $T\Delta S = -1440$ 卡/摩尔。

熵值的变化通常是用 ΔS 而不是用 $T\Delta S$ 表示。

$$T\Delta S = \Delta H - \Delta G \quad \text{或} \quad \Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T}$$

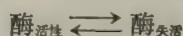
因而, ΔS 的单位为卡 \times 摩尔 $^{-1} \times$ 度 $^{-1}$ 。这个单位叫做熵单位(e. u.); $1\text{e. u.} = 1$ 卡 \times 摩尔 $^{-1} \times$ 度 $^{-1}$ 。ATP 在 25°C 水解时, 其 ΔS 值可计算如下:

$$\Delta S = \frac{-4000 - (-7700)}{298} = \frac{-4000 + 7700}{298} = \frac{3700}{298}$$

$$\Delta S = 12.4 \text{ e. u.}$$

水在 0°C 结冰时, 其 $\Delta S = -1440/273 = -5.3 \text{ e. u.}$ (总的熵值变化——水加上环境接受的热量——则如热力学第二定律所要求的那样, 将为正值)。

为了评价测量 ΔS 的意义, 让我们来看下面的可逆反应:



由于 ΔS 是度量有秩性变化的, 所以上述反应的 ΔS 值可告知我们有关酶失活时分子形状变化的某些情况。 ΔS 有大的正值, 表示酶在失活时伴随有多肽链的展开, 变成有秩性降低、无规性增加的结构。

焓同熵也同自由能一样都是状态函数。所以, ΔH 和 ΔS 也同 ΔG 一样, 只决定于系统的初态和终态, 而与反应的机制和过程无关。因此一个不能直接实现的反应, 如果可以表达为二个或多个反应之和, 而后的 ΔH 和 ΔS 为已知时, 则该反应的 ΔH 和 ΔS 也能计算出来。

例题 3-27

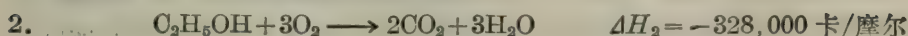
在 25°C 和 1 大气压下, 乙醇的标准燃烧热为 $-328,000$ 卡/摩尔。乙醛的标准燃烧热为 $-279,000$ 卡/摩尔。乙醛/乙醇电极反应的 E° 为 -0.20 伏。 $\frac{1}{2} \text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ 电极反应的 E° 为 $+0.82$ 伏。根据这些数值, 计算乙醇 $+\frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow$ 乙醛 $+\text{H}_2\text{O}$ 这个反应的 (a) ΔH , (b) $\Delta G'$ 和 (c) ΔS 。

解:

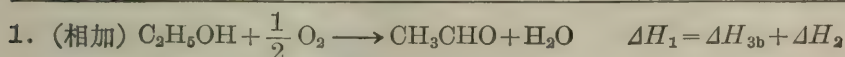
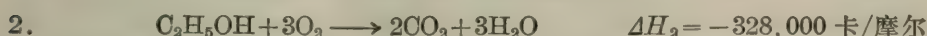
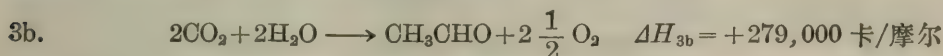
(a) 乙醇氧化成乙醛的反应:



可以用两个 ΔH 为已知的反应式来表示:



将反应 3 反过来写, 然后与反应式 2 相加, 得



$$\Delta H_1 = (+279,000) + (-328,000)$$

$$\Delta H_1 = -49,000 \text{ 卡/摩尔}$$

$$(b) \quad \Delta G' = -n\mathcal{F}\Delta E'_0 = -(2)(23,063)(1.02)$$

$$\Delta G' = -47,049 \text{ 卡/摩尔}$$

$$(c) \quad \Delta G' = \Delta H - T\Delta S$$

$$T\Delta S = \Delta H - \Delta G' = (-49,000) - (-47,049)$$

$$T\Delta S = -1951 \text{ 卡/摩尔}$$

$$\Delta S = \frac{-1951}{298} \quad \Delta S = -6.5 \text{ e. u.}$$

温度对 K'_\mp 的影响—— ΔH 的测定

从 $\Delta G'$ 的两个方程式:

$$\Delta G' = -2.3RT \log K'_\mp \quad \text{和} \quad \Delta G' = \Delta H - T\Delta S$$

可以得到

$$-2.3RT \log K'_\mp = \Delta H - T\Delta S$$

或

$$\log K'_\mp = -\frac{\Delta H}{2.3R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^*}{2.3R} \quad (47)$$

(47) 式中 T 与 $\log K'_\mp$ 间有线性关系. 我们只要测定几个不同温度下的 K'_\mp 值, 然后以 $\log K'_\mp$ 对 $1/T$ 作图(图 3-9), 就可以得到 ΔH 和 ΔS . 另一个办法是将 (47) 式微分, 得到 van't Hoff 方程式:

$$\frac{d \log K'_\mp}{d(1/T)} = -\frac{\Delta H}{2.3R} \quad \text{或} \quad d \log K'_\mp = \frac{\Delta H}{2.3R} d(1/T)$$

求定积分, 在 $1/T_1$ 时为 $\log K'_{\mp 1}$, 在 $1/T_2$ 时为 $\log K'_{\mp 2}$, 得到

$$\log \frac{K'_{\mp 2}}{K'_{\mp 1}} = -\frac{\Delta H}{2.3R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right)$$

或

* 原书误写成 $\frac{\Delta S}{3.3R}$ ——译者注。

$$\log \frac{K'_{\text{平}2}}{K'_{\text{平}1}} = -\frac{\Delta H}{2.3R} \left(\frac{T_2 - T_1}{T_2 T_1} \right) \quad (48)$$

如果在某一温度下 $K'_{\text{平}}$ 为已知, 且 ΔH 也已知, 则可计算在另一温度下的 $K'_{\text{平}}$ 值。或者, 我们能从两个不同温度下的 $K'_{\text{平}}$ 值来求 ΔH 。如果温度增加时 $K'_{\text{平}}$ 增加, 则 ΔH 为正; 如果温度增加时 $K'_{\text{平}}$ 降低, 则 ΔH 为负。在计算中, 假定在所研究的温度范围内 ΔH 为常数。这一假定对于小的温度变动范围是相当正确的, 常用于酶促反应(温度变动范围为 20—40°C)。

如果我们以 $\Delta G'/-2.3RT$ 代替 $K'_{\text{平}}$, 即得到 Gibbs-Helmholtz 方程式的积分式:

$$\frac{\Delta G'_2}{T_2} = \frac{\Delta G'_1}{T_1} - \Delta H \left(\frac{T_2 - T_1}{T_2 T_1} \right) \quad (49)$$

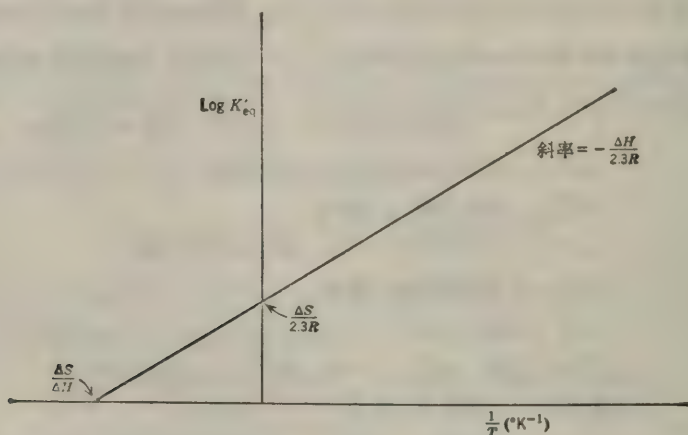


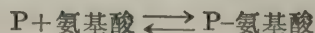
图 3-9 根据两个或多个不同温度下的 $K'_{\text{平}}$ 值, 用图解法求 ΔH (ΔH 为负值。如 ΔH 为正值, 绘出的图形斜率为负)。

例题 3-28

从大肠杆菌中分离出一种结合有氨基酸的蛋白质(可能和膜转运有关)。该蛋白质通过 25°C 和 37°C 的透析平衡测定, 得到的 K_s 值分别为 8.8×10^{-6} 和 3×10^{-5} (K_s 是蛋白质-底物复合物的解离常数)。计算(a)在 25°C 和 37°C 的结合反应 $\Delta G'$ 。(b)此结合反应的 ΔH , 和(c)此结合反应在 25°C 的 ΔS 。(d)在蛋白质与氨基酸的结合过程中, ΔS 的符号和大小对蛋白质构象的变化有什么启示?

解:

(a) 此结合反应为



K_s 值是解离常数。在 25°C 和 37°C 时, 反应之结合常数用 $K'_{\text{平}25^\circ}$ 和 $K'_{\text{平}37^\circ}$ 表示, 有

$$K'_{\text{平}25^\circ} = \frac{1}{8.8 \times 10^{-6}} = 1.14 \times 10^5$$

$$K'_{\text{平}37^\circ} = \frac{1}{3 \times 10^{-5}} = 3.33 \times 10^4$$

$$\Delta G'_{25^\circ} = -1364 \log 1.14 \times 10^5 = -(1364)(5.056)$$

$$\Delta G'_{25^\circ} = -6896 \text{ 卡/摩尔}$$

在 37°C 时, $2.303RT = 1419$ 。

$$\therefore \Delta G'_{37^\circ} = -1419 \log 3.33 \times 10^4 = -(1419)(4.522)$$

$$\Delta G'_{37^\circ} = -6417 \text{ 卡/摩尔}$$

$$(b) \quad \log \frac{K'_{\frac{37^\circ}{25^\circ}}}{K'_{\frac{37^\circ}{25^\circ}}} = \frac{\Delta H}{2.3R} \left(\frac{T_2 - T_1}{T_2 T_1} \right)$$

$$\Delta H = 2.3R \left(\log \frac{K'_{\frac{37^\circ}{25^\circ}}}{K'_{\frac{37^\circ}{25^\circ}}} \right) \left(\frac{T_2 T_1}{T_2 - T_1} \right)$$

$$= (2.3)(1.987)(\log 0.292) \left(\frac{298 \times 310}{12} \right)$$

$$\Delta H = -18,809 \text{ 卡/摩尔}$$

$$(c) \quad T\Delta S = \Delta H - \Delta G' = (-18,809) - (-6896) = -18,809 + 6896$$

$$T\Delta S = -11,913 \text{ 卡/摩尔 在 } 25^\circ\text{C}$$

$$\Delta S = \frac{-11,913}{298}$$

$$\Delta S = -40 \text{ e. u. 在 } 25^\circ\text{C}$$

(d) 因为 ΔS 涉及的不单是蛋白质而是总的熵值变化, 所以我们得不到任何有关蛋白质中构象变化的结论。

$$\Delta S = (S_{p-aa}) - (S_p + S_{aa}) = (S_p + S_{aa})_{\text{结合}} - (S_p + S_{aa})_{\text{自由}}$$

ΔS 负值中的大部分可能是由于结合氨基酸后无规运动受到限制所引起。

H. 活 化 能

碰撞理论和 Arrhenius 方程式

某反应具有很大的负 ΔG 值并不表示该反应以快速(或甚至是可测的速度)进行。如果该反应真进行了, 负 ΔG 值只不过指出反应的方向。任何均相化学反应的反应速度与反应分子间的碰撞频率有关。碰撞频率要受反应分子浓度和分子运动速度(即分子的动能)的影响。分子的动能与温度有关。碰撞频率并不等于反应速度, 因为具有足够能量促进反应的碰撞只占总碰撞数的一小部分。对于有效反应所需的最低能量叫做活化能, 用 E_a 表示。

1889 年 Arrhenius 导出了 E_a 与温度间关系的经验公式。这个关系式通常写成 Arrhenius 方程式的形式:

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad (50)$$

或写成线性方程的形式:

$$\log k = -\frac{E_a}{2.3R} \cdot \frac{1}{T} + \log A \quad (51)$$

Arrhenius 方程式的积分式为

$$\log \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a}{2.3R} \left(\frac{T_2 - T_1}{T_2 T_1} \right) \quad (52)$$

式中 k_2 和 k_1 分别为某一反应在 T_2 和 T_1 时的比反应速度常数。Arrhenius 方程式与 van't Hoff 方程式的形式一样, 只是它所讨论的是速度常数而不是平衡常数。当反应物的浓度恒定时, 速度常数可用速度代替, 因为 v 与 k 成正比(见例题 4-17)。

过渡状态

为了解释有效反应所需的最低能量, Fyring 于 1935 年提出: 反应分子必须克服能障,

而且在进行到反应产物之前先通过过渡状态(图 3-10)。那些只获得部分活化能的反应分子则只是退回到基态。过渡状态可看做是一个不稳定的“中途”(halfway)过渡相,其中键和取向都发生了扭变。反应物一旦克服了能量的障碍并达到了过渡状态,就能继续前进形成反应产物,其速度与温度及反应物的本性无关,即,它们将沿着能阈的另一侧滑向它的基态。

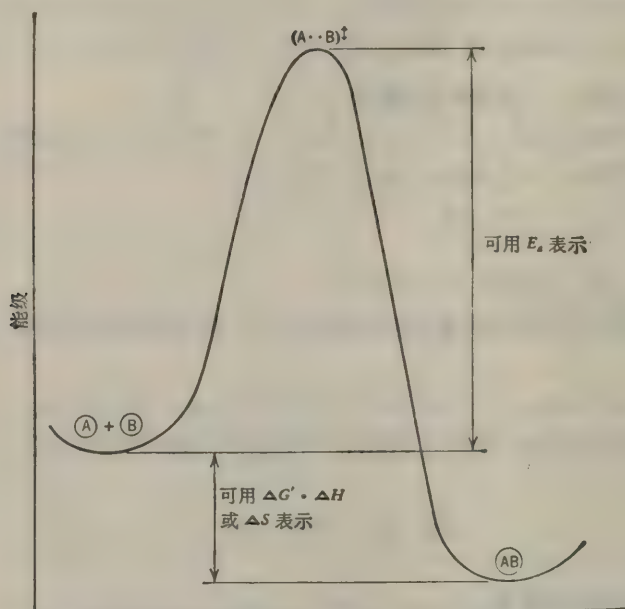


图 3-10 反应 $A+B \rightleftharpoons AB$ 的“能量图”。如图所示,
 $\Delta G'$, ΔH 和 ΔS 为负值, E_a 永为正值。

例题 3-29

在 35°C 时 $A+B \longrightarrow P+Q$ 的反应速度为 25°C 时的两倍。计算此反应的活化能。
解:

$$\log \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a}{2.3R} \left(\frac{T_2 - T_1}{T_2 T_1} \right)$$

$$E_a = \frac{2.3RT_2 T_1 \log \frac{k_2}{k_1}}{T_2 - T_1} = \frac{(2.3)(1.987)(298)(308) \log 2}{10}$$

$$E_a = 12,627 \text{ 卡/摩尔}$$

一般参考文献

- Barrow, G. M., *Physical Chemistry for the Life Sciences*. McGraw-Hill(1974).
Klotz, I. M., *Energy Changes in Biochemical Reactions*. Academic Press(1967).
Lehninger, A. L., *Bioenergetics*. 2nd ed. W. A. Benjamin (1971).
Morris, J. G., *A Biologist's Physical Chemistry*. Addison-Wesley(1968).
Patton, A. R., *Biochemical Energetics and Kinetics*. W. B. Saunders(1965).
Racker, E., *Mechanisms in Bioenergetics*. Academic Press(1965).

练 习 题

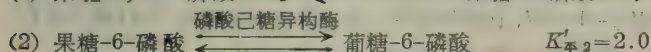
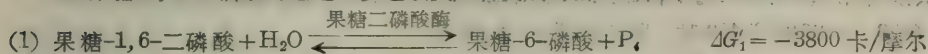
(所需之 $\Delta E'$ 和 $\Delta G'$ 值可查阅附录 VIII 和 IX. 如不另加注明, pH 均假定为 7.) 习题答案见第 306—308 页.

1. 葡萄糖-6-磷酸 \rightleftharpoons 果糖-6-磷酸的 $K'_{\text{平}}$ 为 0.43, 计算反应的 $\Delta G'$.

2. $\text{G-1-P} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{腺苷二磷酸葡萄糖 (ADPG)} + \text{PP}_i$ 的 $K'_{\text{平}}$ 为 1.0. (a) 计算稳态条件下反应的 ΔG , 设 $[\text{G-1-P}] = 10^{-4} \text{M}$, $[\text{ATP}] = 10^{-3} \text{M}$, $[\text{ADPG}] = 10^{-5} \text{M}$ 和 $[\text{PP}_i] = 10^{-5} \text{M}$. (b) 在上述条件下, 自发反应向哪一方向进行?

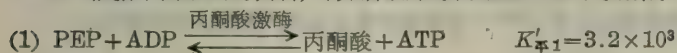
3. 在 pH=7 时, 葡萄糖-6-磷酸或葡萄糖-6-硫酸的水解, 哪一个更易向右进行? 为什么?

4. 果糖-1,6-二磷酸可通过三步连续反应转变成葡萄糖-1-磷酸:



通过上述资料, 计算总反应的 $K'_{\text{平}}$ 和 $\Delta G'$.

5. 根据下面给出的资料, 计算磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 水解成 P_i 和丙酮酸时的 $\Delta G'$.



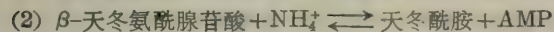
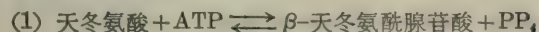
6. 琥珀酸-S-CoA 在 pH7.0 水解时, 其 $\Delta G'$ 约为 -8000 卡/摩尔. 问其中有多少负 ΔG 来自新生成羧基的解离? 羧基的 $\text{p}K_a$ (琥珀酸的 $\text{p}K_{a2}$) 为 5.57 (换言之, 计算 $\Delta G_{\text{离}}$).

7. 天冬酰胺水解成天冬氨酸和 NH_4^+ 时, 其 $\Delta G'$ 为 -3400 卡/摩尔. ATP 水解成 $\text{AMP} + \text{PP}_i$ 时, 其 $\Delta G'$ 为 -8000 卡/摩尔.

(a) 根据以上资料, 计算经由下列总反应生物合成天冬酰胺的 $\Delta G'$. 总反应:



(b) 总生物合成反应分两步进行:



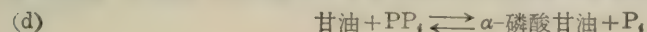
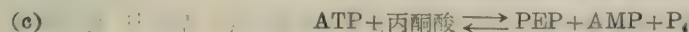
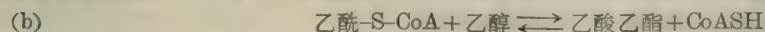
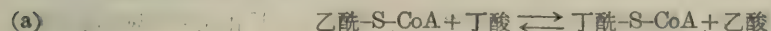
β -天冬氨酰腺苷酸水解时的 $\Delta G'$ 为 -10,000 卡/摩尔. 计算天冬酰胺总合成反应中, 每步反应的 $\Delta G'$.

8. 己糖激酶催化 $\text{ATP} + \text{葡萄糖} \rightleftharpoons \text{葡萄糖-6-磷酸} + \text{ADP}$ 反应进行. 此反应的 $\Delta G' = -4562$, $K'_{\text{平}} = 2.21 \times 10^3$. 计算当葡萄糖为 10^{-6}M , ATP 为 10^{-3}M , ADP 为 10^{-4}M 时, 若使己糖激酶所催化的反应逆转 (向形成葡萄糖和 ATP 的方向进行), 所需之葡萄糖-6-磷酸的浓度.

9. ATP 硫酸化酶催化反应 $\text{ATP} + \text{SO}_4^{2-} \rightleftharpoons \text{APS} + \text{PP}_i$ 进行. APS 为腺苷-5'-磷酸硫酸酐 (AMP-O-SO_3^-) 的缩写符号. 这个反应的 $K'_{\text{平}}$ 为 10^{-8} . 估算 APS 水解成 $\text{AMP} + \text{SO}_4^{2-}$ 时之 $\Delta G'$.

10. 腺苷酸环化酶所催化反应 ($\text{ATP} \rightleftharpoons \text{环 AMP} + \text{PP}_i$) 的 $K'_{\text{平}}$ 为 0.065. 如果 ATP 水解成 $\text{AMP} + \text{PP}_i$ 的 $\Delta G'$ 为 -8000 卡/摩尔. 计算环 AMP 水解 (成 5'-AMP 时) 的 $\Delta G'$.

11. 估算下列反应的 $\Delta G'$:



12. 当葡萄糖-6-磷酸的原始浓度为 (a) $1M$, (b) $0.1M$, (c) $10^{-2}M$, (d) $10^{-3}M$, (e) $10^{-4}M$ 时, 计算由葡萄糖磷酸变位酶所催化的反应中, 葡萄糖-6-磷酸和葡萄糖-1-磷酸的平衡浓度及葡萄糖-6-磷酸/葡萄糖-1-磷酸的浓度比。葡萄糖-1-磷酸 \rightleftharpoons 葡萄糖-6-磷酸的 $K'_{\text{平}}$ 为 19。

13. 当异柠檬酸的原始浓度为 (a) $1M$, (b) $0.1M$, (c) $0.01M$, (d) $10^{-3}M$, 和 (e) $10^{-4}M$ 时, 计算由异柠檬酸酶所催化的反应中 (异柠檬酸 \rightleftharpoons 乙醛酸 + 琥珀酸), 各组分的平衡浓度和浓度比。异柠檬酸酶所催化的反应, 其 $\Delta G'$ 为 $+2110$ 卡/摩尔。

14. 某溶液由下列化合物各 $1M$ 组成: 乙酸乙酯、丙酮酸、 β -羟基丁酸和乳酸。(a) 写出热力学上能进行的氧化-还原反应方程式。(b) 指出在反应过程中, 哪些化合物被氧化, 哪些化合物被还原, 哪些是氧化剂, 哪些是还原剂。(c) 计算反应的 $\Delta E'_0$, $\Delta G'$ 和 $K'_{\text{平}}$ 。

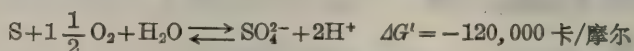
15. 某含有 $0.001M$ 泛醌和 $0.001M$ 泛醌- H_2 的溶液与等体积的含有 $0.1M$ 延胡索酸和 $0.1M$ 琥珀酸的溶液混合。(a) 写出热力学上能进行的反应方程式。(b) 计算反应的 ΔE , $\Delta G'$ 和 $K'_{\text{平}}$ 。

16. 计算黄素蛋白/黄素蛋白- H_2 电极反应的还原电极势, 当氧化态/还原态浓度(活度)比为: (a) 10^{-3} , (b) 0.2 , (c) 1 , (d) 3 , (e) 25 和 (f) 400 时。反应之 $E'_0 = -0.06$ 伏。

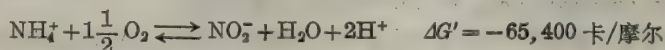
17. (a) 当 $[\text{草酰乙酸}] = 10^{-4}M$, $[\text{苹果酸}] = 10^{-4}M$, 计算使草酰乙酸还原成苹果酸时, $NADH/NAD^+$ 的最低比值。(b) 如果 $[\text{草酰乙酸}] = 10^{-6}M$, $[\text{苹果酸}] = 10^{-4}M$, 该比值又应是多少?

18. 计算 (a) 草酰乙酸/苹果酸电极反应, 和 (b) Fe^{3+}/Fe^{2+} 电极反应, 在 $pH 9.0$ 时的 E'_0 值 (附录 IX 给出的是在 $pH 7$ 时的 E'_0 值)。

19. (a) 硫细菌 (*Thiobacillus thiooxidans*) 在自然界的硫循环中起着重要作用。这种微生物能氧化还原态的无机硫化物, 并在此氧化过程中获得能量以合成 ATP。单质硫的氧化通过下面的反应式进行:



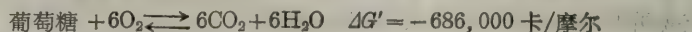
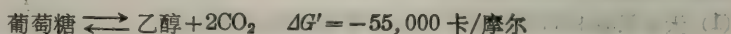
计算在标准状态下及能量保留效率为 40% 时的 ATP 势。(b) *Nitrosomonas* 属的细菌能使 NH_4^+ 氧化成 NO_2^- , 故在自然界的氮循环中起着重要的作用, 总的反应式为



计算在标准状态下及能量保留效率为 40% 时的 ATP 势。

20. 每摩尔 6-碳脂肪酸 (如正己酸) 或每摩尔 6-碳糖 (如果糖) 完全氧化成 $CO_2 + H_2O$ 时, 哪一个产生更多的 ATP?

21. 已知下述的资料:



计算 1 摩尔乙醇完全氧化成 $2CO_2 + 3H_2O$ 时, 能自 $ADP + P_i$ 合成多少摩尔的 ATP。假定在标准状态下能量的保留效率为 44%。

22. 在 $25^\circ C$ 和 $[ATP] = 10^{-6}M$, $[ADP] = 10^{-3}M$, $[P_i] = 10^{-2}M$ 的稳态条件下, 计算由 ATP 酶推动合成 ATP 时, 线粒体内膜两侧的 ΔpH 。

23. 当光的波长为 (a) 260 nm , (b) 750 nm 时, 计算 1 爱因斯坦光子含有的能量。

24. 在有 H_2 存在时, 一种紫色光合细菌 *Chromatium okenii*, 能进行只产生 ATP 的循环光合磷酸化作用 ($NADPH$ 由氢化酶所催化的反应: $H_2 + NADP^+ \rightleftharpoons NADPH + H^+$ 中获得)。当这一对电子以还原态的铁氧还素回传给氧化态的色素系统时, 理论上能形成多少摩尔的 ATP。假定能量保留效率为 40—50%。

25. 血液中含有约 $0.1M$ 的 Cl^- , 脑组织含有约 $0.04M$ 的 Cl^- 。计算 (a) Cl^- 由血液向脑细胞运转时的 ΔG 和 (b) 脑细胞对抗浓度梯度向外部运转 Cl^- 时所消耗的能量。

26. 胃液的 pH 约为 1.5。假定胃粘膜细胞内部的 pH 为 6.8, 计算胃粘膜分泌 1 摩尔 H^+ 离子时所需的能量。假定 $T = 37^\circ C$ 。

27. (a) 进行活跃呼吸的 *Neurospora crassa* 产生 -0.30 伏的膜电势 (内部为负)。当 Ca^{2+} 向菌丝体中运传时, ΔG 的值是多少? 假定在稳态条件下, ATP 酶将 Ca^{2+} 移向外部, 以维持 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{外}}/[\text{Ca}^{2+}]_{\text{内}}$ 的比值为 1. (b) 如果氨基酸的吸收与 Ca^{2+} 的流动偶联在一起, 氨基酸聚集的浓度比应是多少?

28. 乙醛燃烧时的 ΔH 为 $-279,000$ 卡/摩尔. 反应式为 $\text{CH}_3\text{CHO} + 2\frac{1}{2}\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$. 乙酸燃烧时的 ΔH 为 $-209,000$ 卡/摩尔, 反应式为 $\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$. 用这些数据, 及乙醛/乙酸和 $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ 电极反应在 25°C 时的标准还原电极势, 计算反应 $\text{CH}_3\text{CHO} + \frac{1}{2}\text{O}_2 \longrightarrow \text{CH}_3\text{COOH}$ 的 ΔH , $\Delta G'$, $T\Delta S$ 和 ΔS .

29. 某脱氨反应在 20°C 时的 $K'_{\text{平}}$ 为 185. 在 37°C 时的 $K'_{\text{平}}$ 为 65. (a) 计算在 37°C 时的 ΔH , $\Delta G'$, $T\Delta S$ 和 ΔS . (b) 28°C 时的 $K'_{\text{平}}$ 是多少?

30. *Neurospora crassa* 蛋白激酶的活化能为 $10,700$ 卡/摩尔. 这个反应在 37°C 时的反应速度比在 15°C 时快多少?

(吴经才译 董振芳校)

第四章 酶

A. 酶作为生物催化剂

活化能

某反应具有一个很大的负自由能变化这一事实并不意味着反应将以快速方式进行。负的 $\Delta G'$ 只表示原有[产物]/[反应物]比值小于平衡时的比值。例如，葡萄糖的氧化作用其 $\Delta G'$ 为 $-686,000$ 卡/摩尔，即在热力学意义上葡萄糖在空气中是十分不稳定的。然而，葡萄糖以固态结晶存在或在灭菌溶液中并不能以可测出的速度分解成 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ 。因此，在动力学意义上葡萄糖是十分稳定的。

一个反应物分子或底物 S ，在变成产物 P 以前，它必需具有一定的最小能量，以便进入 $S \cdot P^\ddagger$ 的过渡态(图 4-1)，其所需的能量称为活化能。正如在第三章中所指出的，过渡态相当于一个中途点，该处 S 键充分地扭曲，以便能转变成 P 。 $S \rightarrow P$ 的反应速度取决于每单位时间内进入过渡态的 S 分子的数量。增加反应速度有两个办法：一个是提高温度；另一个是降低活化能。活细胞一般生存在较低的温度下——介于 0° 和 100°C 之间。在生存的温度下，以仅能使细胞生长和维持的速度下所发生的中间代谢反应，即使有也是少数的。活细胞能够生存在比较温和的环境条件下是因为它们具有酶——生物催化剂，可以有选择性地降低重要化学反应的活化能。在有适当的酶存在时，环境温度给很大一部分反应物分子提供了所需的活化能。一个在 25°C 进行的酶促反应可能比同样的非催化反应要快 10^6 到 10^{15} 倍。

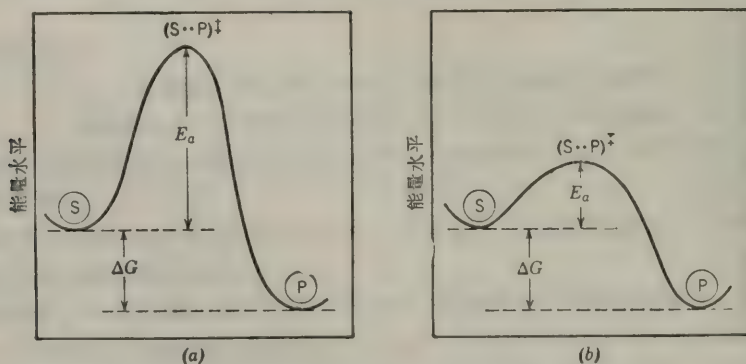


图 4-1 ΔG 和 E_a 。(a) 非酶促反应的；(b) 酶促反应的。

酶对反应的 ΔG 或 $K_{\text{平}}$ (平衡常数) 没有影响。它们只增加反应趋向平衡的速度。例如，在 $S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} P$ 的反应中， k_1 可能是 10^{-3}分^{-1} ，而 k_{-1} 可能为 10^{-5}分^{-1} ，平衡时，正反应和逆反应相等，因此

$$v_f = k_1[S] = v_r = k_{-1}[P]$$

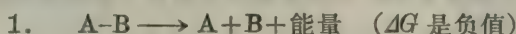
$$K_{\text{平}} = \frac{[P]}{[S]} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{10^{-3}}{10^{-5}} = 100$$

在有适当的酶存在时, k_1 和 k_{-1} 都提高到同一程度, 于是, 如果 k_1 增大 10^6 倍, k_{-1} 必定也增大 10^6 倍, ΔG 和 $K_{\text{平}}$ 无变化(图 4-1b)。

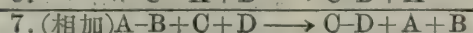
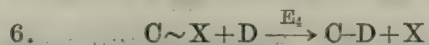
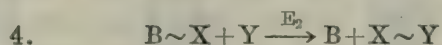
$$K_{\text{平}} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{10^3}{10} = 100$$

酶作为偶联反应的介体

酶不仅加速反应, 它们还以产物的方式偶联反应, 例如, 假定有以下两个反应:



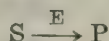
A-B 的裂解能供给充足的能量以促使 C-D 的合成。然而, 如果反应 1 和反应 2 发生在不同的时间, 于细胞的不同部位, 即使这两个反应都是以快速发生的, 也无法利用反应 1 的能量以推动反应 2。在活细胞中, 总过程可能以如下产物的方式偶联:



在反应 3 中, 酶 E_1 裂解了 A-B, 而所产生的能量的一部分用于缩合 B 与 X 以产生 B 的活化形式。贮存在 B~X 中的能量, 在由 E_2 催化的反应中, 当 X 转移到 Y 时被保存了下来。所得到的 X~Y, 象 ATP 那样, 是一个易变的“高能”化合物。C+D 的总缩合作用的发生要经过两步酶促反应: 首先, C 要活化成 C~X 形式; 然后, C~X 与 D 缩合以形成最终产物 C-D。全部的偶联反应序列是由四种不同的酶所催化的。

活性部位

酶促反应 $S \longrightarrow P$ 可以写为



而且, 人们很早就认识到, 酶 E 与底物在反应时必定以某种方式结合。整个反应顺序可以写为



虽然酶参加了上述反应序列, 但它不被消耗。这样, 仅仅几个 E 分子每秒钟就能催化成千上万个 S 分子使之转变成 P。由以下几点可以推断出酶-底物复合体 ES 的存在: (a) 酶所表现的高度专一性; (b) 速度对底物浓度曲线的形状; 和 (c) 底物经常保护酶不至失活的事实。酶的高度专一性激励了 Emil Fischer 于 1894 年提出模板或锁和钥匙的假说。该假说假定酶具有一个称做活性部位的区域, 该区域与底物分子的大小、形状和化学性质是互补的(图 4-2)。Koshland 的易适应的酶或诱导契合的更近代的假说提出了活性部位不需要是事先已存在的、坚硬的几何空腔, 而是通过与底物接触诱导出来的氨基酸 R 基团特异和精密的空间排列(图 4-3)。

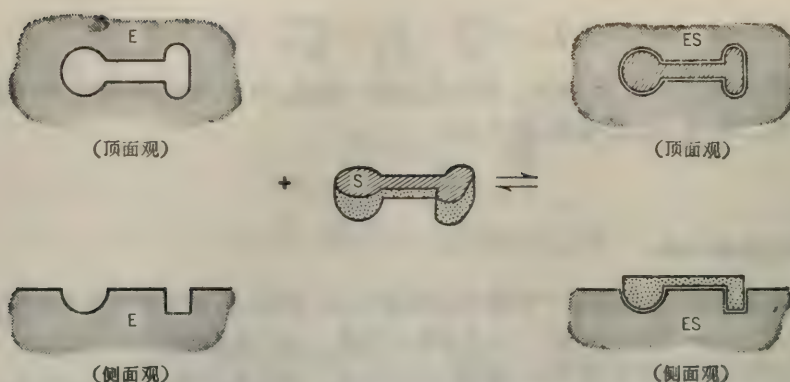


图 4-2 酶专一性的锁和钥匙(模板)假说。

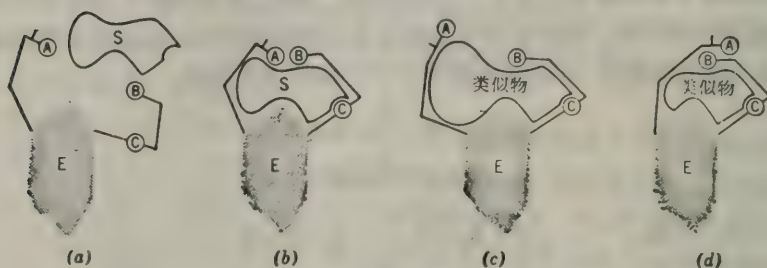


图 4-3 Koshland 的诱导契合假说。(a) 底物接近活性部位；(b) 底物结合诱导了催化基团 A 与 B 的适当排列；(c) 和 (d) 底物类似物（竞争性抑制剂）与酶结合（由基团 C 帮助）使催化基团不能适当地排列 [复制自 D. E. Koshland, Jr., *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 28, 473 (1963)]。

酶的活性部位只占酶分子的很小部分, 实际上, 可能是只有十二个左右的氨基酸残基围

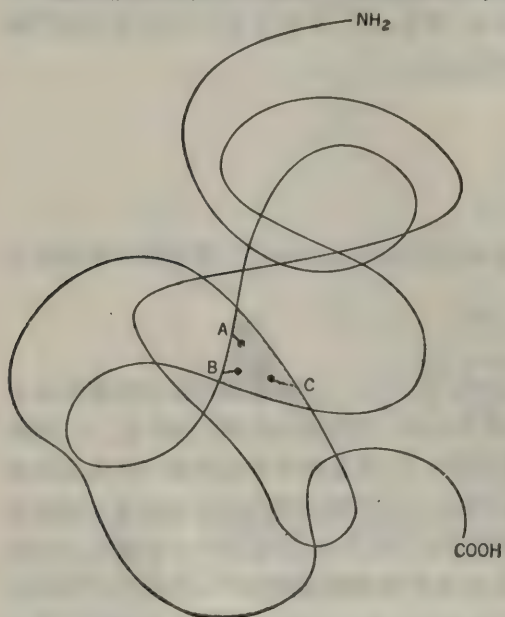


图 4-4 活性部位只占酶的一个小范围(阴影区域)。A, B 和 C 为担负与底物结合和催化活力的氨基酸 R 基团。

绕成的吸收袋, 而其中仅有两三个能实际上参与底物的结合和(或)起催化作用。既然如此, 为什么酶类是大的蛋白质而不是小的三肽或十二肽呢? 当我们考虑到该两三个必需的 R 基团必须在三度空间完备地并置时, 答案就明确了。一个小的直链肽理应含有全部必需的结合基团和催化基团, 但是, 固定的键距和键角不会允许必需的 R 基团采取需要的空间关系。由数以百计的氨基酸残基所组成的大蛋白质能够自身弯曲、盘绕和折叠, 从而使必需的 R 基团恰好在空间位置上固定(图 4-4)。组成催化中心的该三个必需基团可能是第 40, 41 和 92 残基。其余(非催化的)大量的氨基酸残基在维持酶的三级结构中亦起着同等的重要作用(通过静电的相互作用, 氢键, 偶极-偶极相互作用, 二硫键和疏水的相互作用)。

决定酶催化效率的因素

我们既已研究了活性部位的概念,我们可以回到一个重要问题上:酶如何降低活化能?许多因素已指出我们可以通过定性的途径进行考查.首先,人们通常认为多数酶促反应是经过公认的有机反应机制进行的(例如,普通的酸碱催化,亲核的和亲电子的置换),其中,酶提供了催化基团.当然,酶所加速的某些反应,可归因于接近和定向因素.对于起反应的二个底物分子(或一个底物分子和一个催化基团)来说,它们必须相互靠紧并且必须以适当角度接近.在溶液中,两个分子随机运动的有效碰撞几率总是低的.当这两个分子吸附在酶的活性部位时(或当一个反应物是底物而另一个反应物是活性部位的一个 R 基团时),这两个分子间的距离和定向就可能都是最适当的.底物在活性部位体积内的有效“浓度”比其在中吸收了底物的溶液的浓度要大得多. Koshland 及其同事们曾提出,酶的活性部位的构造使底物和催化基团为进入过渡态排列了最适宜的轨道.这个概念称做轨道取向 (orbital steering). Milstien 和 Cohen 讨论了性质上相似的立体总控制 (stereopopulation control) 概念. 这些研究者指出,多点连接的联合效应和底物进入活性部位的精确契合,往往引起对底物旋转自由度的限制并使之“冻结”成唯一的构象. 我们也能预料到,底物约束在酶的活性部位上之后就会有一个较长的居留时间(这个时间间隔是和同样的底物在彼此间的碰撞距离内相比较的,如果它们在溶液中是随机运动的话). 由于底物抛锚(由 Reuben 所称)的结果,每单位时间内,达到过渡态的底物分子数目可能大量地增加.

一些研究工作者提出了底物的某些键因结合到酶上而变形的概念. 这个所谓的断裂机制 (rack mechanism) 假定,底物很松地契入活性部位里,但由于酶和底物之间形成的键是如此牢固,以致使底物里的敏感键扭曲产生活化了的过渡态(图 4-5). 在这一机制中,该活化能的一部分是直接由 E 和 S 间的结合力提供的. 虽然对裂解反应机制用图解来说明是容易的,而对于缩合作用和基团转移反应来说,其底物的过渡态与酶的结合比未活化的底物与酶的结合更牢固,这同样也可不费力地设想出类似的变形模型.

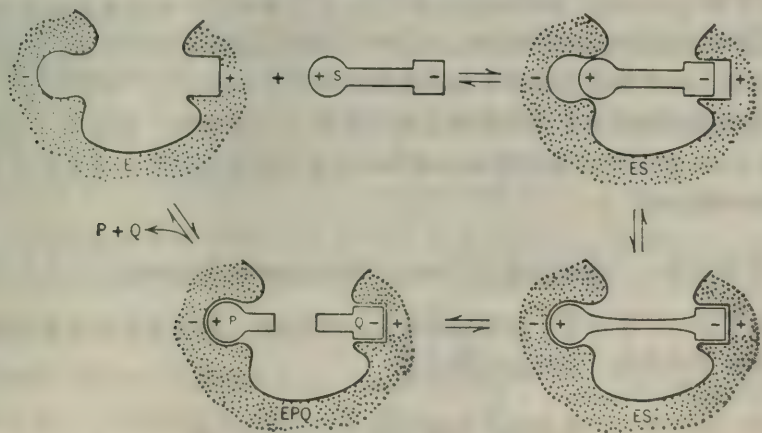


图 4-5 变形或断裂机制。

例题 4-1

在大多数的体外试验条件下,使用酶的催化量为 10^{-12} 到 $10^{-8}M$, 试估算活细胞中酶的浓

度。假定(a)新鲜组织含水 80% 并全部在胞内; (b)细胞内的总可溶性蛋白表示为细胞湿重的 15%; (c)所有可溶性蛋白都是酶; (d)蛋白质的平均分子量为 150,000; 和(e)大约存有 1000 种不同的酶。

解:

可溶性蛋白(酶)在胞内的浓度是

$$\frac{150 \text{ 克蛋白质}}{1000 \text{ 克湿重}} = \frac{150 \text{ 克蛋白质}}{800 \text{ 克水}} = 0.1875 \text{ 克蛋白质/克水}$$

或

$$187.5 \text{ 克/升}$$

总摩尔浓度为

$$\frac{187.5 \text{ 克/升}}{150,000 \text{ 克/摩尔}} = 1.25 \times 10^{-3} M$$

如果有 1000 种不同的酶, 每种酶的平均浓度是

$$\frac{1.25 \times 10^{-3}}{10^{-3}} = 1.25 \times 10^{-6} M$$

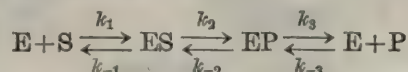
于是, 我们可以认为: 单个酶的浓度范围为 10^{-8} 至 $10^{-4} M$ (参见例题 4-22 用另一方法估算的酶的胞内浓度)。

B. 酶动力学

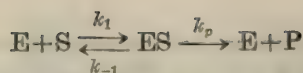
酶动力学是酶学的一个分支, 它以处理影响酶促反应速度的诸因素为内容。最重要的因素是酶浓度, 配体(底物、产物、抑制剂和激活剂)浓度, pH, 离子强度和温度。当恰当地分析所有这些因素时, 就可能知道很多有关酶促反应的性质。例如, 通过改变底物和产物的浓度, 有可能推论出反应的动力学机制, 即底物结合和产物脱离酶的级数以及究竟这个级数是强制的还是随机的。这样的研究还可确定形成酶-底物和酶-产物复合体的种类以及有时为稳定的、共价结合的中间产物的存在提供证据, 而这种中间产物用普通化学分析法是检测不出的。我们能测定出某些动力学常数, 并从中可推断出通常胞内底物和产物的浓度以及反应的生理学方向。反应的动力学还可指出体内调节酶活力的方式。不同的 pH 和温度对动力学常数影响的研究能提供鉴定活性部位氨基酸 R 基团的资料。动力学分析能够建立酶促反应模型; 反之, 酶的动力学原理可用来为一个引人注目的模型书写其速度方程, 还可用实验的方法检验该方程。

简单的单反应物系统——快速平衡法(Henri, Michaelis 和 Menten)

最简单的酶促反应就是单一的底物形成单一的产物。这个系统在通常使用的 Cleland 名词汇编中称做单单系统。该反应的顺序是



ES 和 EP 称为中心复合体。为简化起见, 我们假定只有一个中心复合体并假定逆反应无意义。如果我们所关心的是在 P 积累了一定浓度之前正反应方向的初速度, 这后一假定是有根据的。于是, 考虑中的反应可写为



速度方程可从两个方法中的任一个导出。最简单的方法是假定快速平衡条件，即 E, S 和 ES 的平衡比 ES 分解为 E+P 的速度快很多。在任一时间上的瞬时速度取决于 ES 的浓度：

$$v = k_p [ES]$$

k_p 称做催化速度常数。全部的酶分配到了 E 和 ES 之中：

$$[E]_t = [E] + [ES]$$

以 $[E]_t$ 除以速度-相关方程，式中 $[E] + [ES]$ 写在方程的右侧，我们得

$$\frac{v}{[E]_t} = \frac{k_p [ES]}{[E] + [ES]}$$

由于该平衡的假定， $[ES]$ 可用 $[S]$ 、 $[E]$ 和 K_s 项表示，这里的 K_s 是 ES 复合体的解离常数：

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad \therefore [ES] = \frac{[S]}{K_s} [E]$$

代入 $[ES]$ ：

$$\frac{v}{[E]_t} = \frac{k_p \frac{[S]}{K_s} [E]}{[E] + \frac{[S]}{K_s} [E]}$$

或，交叉乘以 k_p 并消去 $[E]$ ：

$$\frac{v}{k_p [E]_t} = \frac{\frac{[S]}{K_s}}{1 + \frac{[S]}{K_s}}$$

如果 $v = k_p [ES]$ ，则 $k_p [E]_t = V_{\text{最大}}$ ，即当全部的酶都以 ES 存在时，所观察到的最大速度。

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{\frac{[S]}{K_s}}{1 + \frac{[S]}{K_s}} \quad (1)$$

快速平衡系统全部的速度方程都可用上述方式导出。这最后的方程式右边的分子将含有相当于形成产物的复合体的项；分母将含有存在的每一种酶形式的项。对任一给定的复合体项来说，都含有一个分子和一个分母。该项的分子是复合体中全部配体浓度的乘积；该项的分母是复合体和游离 E 之间全部解离常数之乘积。最后的速度方程式分母上的“1”代表游离的 E。在简单的单一反应物系统中，只有一种产物形式的复合体 (ES) 和两种酶形式 (E 和 ES)。因此，最后的速度方程式的分子只有一项，而分母有两项。简单的单一反应物系统的速度方程，经重新整理就成为大家较熟悉的 Henri-Michaelis-Menten 方程：

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (2)$$

Henri-Michaelis-Menten 方程给出了在一定的底物浓度下与 $V_{\text{最大}}$ 有关的瞬时速度或初速度。如果 v 只在一个很短的时间内测定，以便使 $[S]$ 基本上保持不变的话，该方程是正确的；这就要求在试验期间利用的底物不超过 5%。

稳态法 (Briggs 和 Haldane)

如果 ES 形成 E+P 的速度比 ES 逆向解离成 E+S 的速度要快的话，则 E, S 和 ES 将

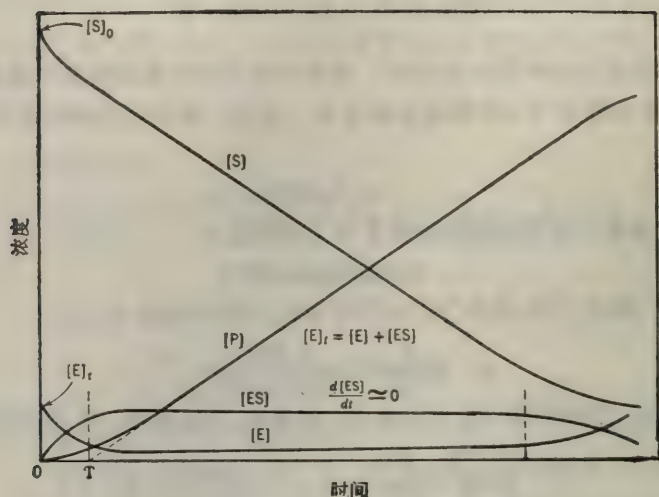
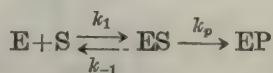


图 4-6 催化反应的进程曲线。其中，初始反应物(底物)浓度 $[S]_0$ 比原始酶浓度 $[E]_0$ 要大得多。当 $[S]_0/[E]_0$ 增大时，稳态区域构成总反应时间的增大部分。 T 表示前稳态区间。

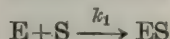
不能处于平衡(ES 不能积累平衡水平的)。如果酶以“催化的”数量存在(即 $[S] \gg [E]_t$)，则当 E 和 S 混合后不久，稳态就会建立，其中，ES 的浓度随时间基本上保持不变(图 4-6)。用与前面叙述过的很相似的方法可推导出速度方程。但这时，ES 的浓度是得自稳态方程而不是得自平衡公式。其反应顺序是



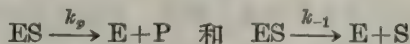
照例：

$$v = k_p [ES] \quad \frac{v}{[E]_t} = \frac{k_p [ES]}{[E] + [ES]} \quad (2a)$$

如果 ES 的浓度不变，则 ES 的形成速度与 ES 的分解速度相等。ES 由一步形成：



ES 的分解则经由两个步骤：



$$\therefore \text{ES 生成速度} = k_1 [E] [S]$$

$$\text{ES 分解速度} = k_{-1} [ES] + k_p [ES] = (k_{-1} + k_p) [ES]$$

在稳态时， $d[ES]/dt = 0$ 或

$$k_1 [E] [S] = (k_{-1} + k_p) [ES]$$

解 $[ES]$ ：

$$[ES] = \frac{k_1 [E] [S]}{(k_{-1} + k_p)}$$

这三个速度常数的组合可定义为单一的“Michaelis”常数 K_m ：

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_p}{k_1} \quad \therefore \quad ES = \frac{[S]}{K_m} [E]$$

将上式代入速度相关方程(2a)得

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{\frac{[S]}{K_m}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad \text{或} \quad \frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

于是, 速度方程的形式与对快速平衡条件的推导是一样的, 只是由速度常数组成的最后常数 K 不同. 注意, 对 $[ES]$ 的表达可重新整理为

$$K_m = \frac{[S][E]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_p}{k_1}$$

于是, K_m , 即 Michaelis 常数, 是动态的或假平衡常数, 表示实际的稳态浓度之间的关系而不是平衡浓度之间的关系. 如果 k_p 与 k_{-1} 非常小, 则 K_m 就化为 K_s . 更实际的反应顺序 $E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P$ 的稳态处理产生同样的最终速度方程, 即使现有的 K_m 是由所有步骤的速度常数所组成的一个更复杂的函数. 于是, 在缺乏与不同速度常数有关的相对值的其它数据时, K_m 没有任何肯定的物理意义. 尽管如此, K_m 仍然是表示酶促反应速度与底物浓度有关的一个重要常数. 对 Henri-Michaelis-Menten 方程的考查表明, K_m 等于产生一半最大速度时的底物浓度:

$$v = \frac{[S]}{K_m + [S]} V_{\text{最大}}$$

$$\therefore \text{当 } [S] = K_m \text{ 时: } v = \frac{K_m}{K_m + K_m} V_{\text{最大}} = \frac{1}{2} V_{\text{最大}}$$

为什么测定 K_m ?

K_m 数值因下列几个原因而有意义: (a) K_m 确定了胞内底物水平的近似值. 胞内这一底物水平决不会显著地大于或小于 K_m . 如果 $[S]_{\text{胞内}} \ll K_m$, v 对 $[S]$ 的变化会很敏感, 但由于 $v \ll V_{\text{最大}}$, 酶的大部分催化潜力会被消耗掉. 既然 v 不能超过 $V_{\text{最大}}$, 以及 v 在 $[S] = K_m$ 和 v 在 $[S] = 1000 K_m$ 时两者间只差二倍, 那么, 保留 $[S] \gg K_m$ 也就没有生理学上的意义了. 同样, 在 $[S] \gg K_m$ 时, v 对 $[S]$ 的小变化也变得不敏感了. (b) 由于已知酶的 K_m 是一个常数, 其数值为来自不同机体或同一机体的不同组织或不同发育阶段的同一组织提供了相比较的方法. 这样, 我们可以确定酶 A 是否与酶 B 相同或者它们是否是催化同一反应的不同蛋白质 (注意, $V_{\text{最大}}$ 不是一个常数, $V_{\text{最大}}$ 取决于常数 k_p 和试验中酶的浓度). (c) 配体引起 K_m 有效值的变化是调节酶活力的一种方式. 如果在体外测定的 K_m 似乎是“非生理的”高, 那么我们可以寻找在体内有降低 K_m 有效性的激活剂. 通过测量不同化合物对 K_m 的效应, 我们也同样可以用生理学的方法鉴别重要抑制剂. (d) 如果我们知道了 K_m , 我们可以调整试验条件, 以便使 $[S] \gg K_m$, 并从而测定 $V_{\text{最大}}$, 该 $V_{\text{最大}}$ 是 $[E]_t$ 的一个量度. (e) Michaelis 常数表示出个别酶对替换底物的相对“适用性”, 即具有最低 K_m 值的底物对酶有最高的表观亲和力 (“最好的”底物有最高的 $V_{\text{最大}}/K_m$ 比).

例题 4-2

已知反应 $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_p} E + P$, 式中, $k_1 = 1 \times 10^7 M^{-1} \times \text{秒}^{-1}$, $k_{-1} = 1 \times 10^3 \text{秒}^{-1}$ 和 $k_p = 3 \times 10^2 \text{秒}^{-1}$, 计算 (a) K_s 和 (b) K_m ; (c) k_p 比 k_1 会大得很多吗?

解:

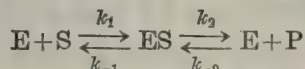
$$(a) \quad K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{1 \times 10^3 \text{ 秒}^{-1}}{1 \times 10^7 M^{-1} \times \text{秒}^{-1}} = 1 \times 10^{-5} M$$

$$(b) \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_p}{k_1} = \frac{(1 \times 10^3 \text{ 秒}^{-1}) + (3 \times 10^3 \text{ 秒}^{-1})}{1 \times 10^7 M^{-1} \times \text{秒}^{-1}} \\ = \frac{4 \times 10^3 \text{ 秒}^{-1}}{1 \times 10^7 M^{-1} \times \text{秒}^{-1}} = 4 \times 10^{-5} M$$

(c) 学生们常常有 k_p 不能大于 k_1 的错误概念, 因为如果 $k_p \gg k_1$, 就会意味着“ES 破坏的比它形成的更快”。首先, k_p 和 k_1 的单位不同, 不能直接比较; k_1 的单位是 $M^{-1} \times \text{秒}^{-1}$ 或 $M^{-1} \times \text{分}^{-1}$, 而 k_p 的单位是 秒^{-1} 或 分^{-1} 。此外, k_1 和 k_p 不是速度而是速度常数 (分别为第二级和第一级速度常数)。ES 形成的速度是 $k_1[E][S]$, ES 解离为 $E+P$ 的速度是 $k_p[ES]$ 。因此, k_p 在数值上比 k_1 大得很多是完全可能的。但是对任一给定的底物和酶浓度来说, $k_p[ES]$ 不会超过 $k_1[E][S]$ 。至于 $k_p \gg k_{-1}$ 也是完全可能的 (在该情况下, K_m 化为 k_p/k_1)。

动力学常数和平衡常数间的 Haldane 关系

我们推导出的常数 K_m 和 $V_{\text{最大}}$ 是用总反应的各速度常数表示的。总反应的平衡常数是由同样的各速度常数组成的。因此, 用 K_m 和 $V_{\text{最大}}$ 表示 $K_{\text{平}}$ 照理说是可能的。例如, 有一简单的两步反应表示如下:



该反应可以在任一方向上测量。我们将把 S 和 P 的 K_m 值分别标做 K_{mS} 和 K_{mP} , 把正方向和反方向的最大初速度分别标做 $V_{\text{最大正}}$ 和 $V_{\text{最大反}}$ 。如前所示:

$$K_{mS} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad \text{和} \quad V_{\text{最大正}} = k_2[E];$$

通过相同的稳态处理, 我们可以证明:

$$K_{mP} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_{-2}} \quad \text{和} \quad V_{\text{最大反}} = k_{-1}[E];$$

从左向右看, 反应的总平衡常数是各步平衡常数的乘积; 并可用各速度常数表示:

$$K_{\text{平}} = K_1 K_2 = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}}$$

我们可以用 K_m 值和 $V_{\text{最大}}$ 值来表示这一组速度常数如下:

$$\frac{V_{\text{最大正}}}{K_{mS}} = \frac{k_1 k_2 [E]}{k_2 + k_{-1}}, \quad \frac{V_{\text{最大反}}}{K_{mP}} = \frac{k_{-2} k_{-1} [E]}{k_2 + k_{-1}}$$

现在, 用一个比值通除另一个比值, 得

$$\frac{V_{\text{最大正}}/K_{mS}}{V_{\text{最大反}}/K_{mP}} = \frac{(k_1 k_2 [E]) (k_2 + k_{-1})}{(k_2 + k_{-1}) (k_{-2} k_{-1} [E])}$$

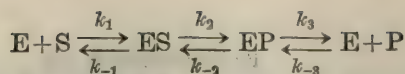
或

$$\frac{V_{\text{最大正}} K_{mP}}{V_{\text{最大反}} K_{mS}} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}} = K_{\text{平}} \quad (4)$$

$K_{\text{平}}$, K_m 和 $V_{\text{最大}}$ 之间的关系即已知的 Haldane 方程。

可逆反应——产物对正向速度的影响

严格地说, 所有的酶促反应都是可逆的。总反应可表示为



在通常试验条件下, 速度是在反应的早期, 在产物浓度增长到一个显著水平之前测定的。对于上面指出的反应顺序, 我们可自适当的 Henri-Michaelis-Menten 方程在任一方向计算反应的初速度。

$$\text{当 } [P] = 0 \text{ 时, } v_{\text{正}} = \frac{V_{\text{最大正}} [S]}{K_{mS} + [S]}$$

$$\text{和当 } [S] = 0 \text{ 时, } v_{\text{反}} = \frac{V_{\text{最大反}} [P]}{K_{mP} + [P]}$$

检查产物对正反应初速度的影响是有益的。例如, 假定我们有一个溶液, 含一定浓度的 S 和一定浓度的 P。在无适当的酶时, 该反应并不能以可测量出的速度发生。现在我们加入催化可逆反应 $S \rightleftharpoons P$ 进行的酶, 反应将朝哪个方向并以什么样的速度进行? 反应的方向将取决于和相对于 $K_{\text{平}}$ 的 $[P]/[S]$ 比值。净速度 ($v_{\text{净}}$) 方程能够很容易地从快速平衡假定中导出 (其中, $K_{mS} = K_S$ 和 $K_{mP} = K_P$)。

$$\begin{aligned} v_{\text{净}} &= k_2[ES] - k_{-2}[EP] \\ \frac{v_{\text{净}}}{[E]_t} &= \frac{k_2[ES] - k_{-2}[EP]}{[E] - [ES] + [EP]} \\ [ES] &= \frac{[S]}{K_S} [E] \quad [EP] = \frac{[P]}{K_P} [E] \\ \therefore \frac{v_{\text{净}}}{[E]_t} &= \frac{k_2 \frac{[S]}{K_S} [E] - k_{-2} \frac{[P]}{K_P} [E]}{[E] + \frac{[S]}{K_S} [E] + \frac{[P]}{K_P} [E]} \\ v_{\text{净}} &= \frac{k_2 [E]_t \frac{[S]}{K_S} - k_{-2} [E]_t \frac{[P]}{K_P}}{1 + \frac{[S]}{K_S} + \frac{[P]}{K_P}} \\ v_{\text{净}} &= \frac{V_{\text{最大正}} \frac{[S]}{K_S} - V_{\text{最大反}} \frac{[P]}{K_P}}{1 + \frac{[S]}{K_S} + \frac{[P]}{K_P}} \quad (5) \end{aligned}$$

$$\text{或 } v_{\text{净}} = \frac{V_{\text{最大正}} \left([S] - \frac{[P]}{K_{\text{平}}} \right)}{K_S \left(1 + \frac{[P]}{K_P} \right) + [S]} \quad \text{在式中, } K_{\text{平}} = \frac{V_{\text{最大正}} + K_P}{V_{\text{最大反}} K_S} \quad (6)$$

稳态处理可产生以 K_{mS} 和 K_{mP} 代替 K_S 和 K_P 同样的最终方程。在上述方程的分子上, 我们用 $[S]$ 和 $[S]$ 平衡值间的差值代替通常的 $[S]$, 分母上的 K_S 项经某些修正使产物对底物的作用如同竞争性抑制剂一样。换言之, 初始净速度取决于系统对平衡状态的偏离 (即热力学的推动力) 和酶与产物的结合数量。竞争性抑制剂的更详细的说明将在下一节中介绍。

速度对底物浓度的曲线

当以初速度对底物浓度作图时, 所得的曲线可用 Henri-Michaelis-Menten 方程式描述。图 4-7 所展示的曲线是一条以 $V_{\text{最大}}$ 和 $-K_m$ 为极限的正矩形双曲线, 其曲率是固定的,

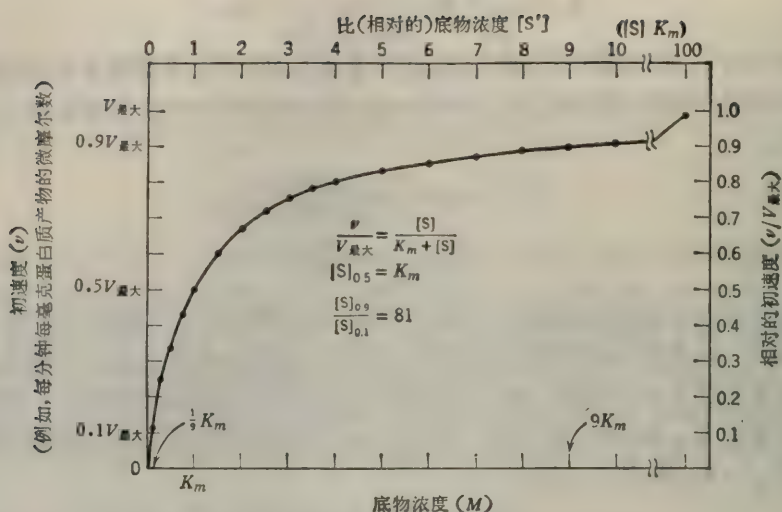


图 4-7 v 对 $[S]$ 作图的曲率是恒定的。无论 K_m 和 $V_{\text{最大}}$ 的绝对值是多少, $[S]_{0.9}/[S]_{0.1}$ 总是等于 81。

与 K_m 和 $V_{\text{最大}}$ 的数值无关。因此, 对一切遵守 Henri-Michaelis-Menten 动力学的酶来说, $V_{\text{最大}}$ 的任意两个分数的底物浓度比是恒定的。例如, 90% $V_{\text{最大}}$ 所需的底物浓度与 10% $V_{\text{最大}}$ 所需的底物浓度之比总是 81, 如下所示:

$$\text{当 } v = 0.9V_{\text{最大}} \text{ 时, } 0.9 = \frac{[S]_{0.9}}{K_m + [S]_{0.9}} \quad [S]_{0.9} = 9K_m$$

$$\text{当 } v = 0.1V_{\text{最大}} \text{ 时, } 0.1 = \frac{[S]_{0.1}}{K_m + [S]_{0.1}} \quad [S]_{0.1} = \frac{K_m}{9}$$

$$\therefore \frac{[S]_{0.9}}{[S]_{0.1}} = 81$$

例题 4-3

(a) 在 $[S] = 4K_m$, $[S] = 5K_m$, $[S] = 6K_m$, $[S] = 9K_m$ 和 $[S] = 10K_m$ 时, 所观察到 $V_{\text{最大}}$ 的分数是什么? (b) 计算 $[S]_{0.9}/[S]_{0.5}$ 和 $[S]_{0.75}/[S]_{0.5}$ 的比值。

解:

(a) 我们可以毫不犹豫也无须置换地表示如下:

$$\text{在 } [S] = 4K_m \text{ 时, } v = \frac{4}{5} V_{\text{最大}}$$

$$\text{在 } [S] = 5K_m \text{ 时, } v = \frac{5}{6} V_{\text{最大}}$$

$$\text{在 } [S] = 6K_m \text{ 时, } v = \frac{6}{7} V_{\text{最大}}$$

$$\text{在 } [S] = 9K_m \text{ 时, } v = \frac{9}{10} V_{\text{最大}}$$

$$\text{在 } [S] = 10K_m \text{ 时, } v = \frac{10}{11} V_{\text{最大}}$$

(b) 如上所表明的, 当 $[S]_{0.9} = 9K_m$ 时, 自然, $[S]_{0.5} = K_m$; 所以, 无论 $V_{\text{最大}}$ 和 K_m 的绝对值是什么, $[S]_{0.9}/[S]_{0.5}$ 的比总是 9。在 $[S] = 3K_m$ 时, 我们观察到 $0.75V_{\text{最大}}$, 那么, $[S]_{0.9}/[S]_{0.75}$ 的比总是 3。

* 原文可能有误, 似应为 $[S]_{0.75}/[S]_{0.5}$ ——译者注。

例题 4-4

下列数据是对酶促反应 $S \longrightarrow P$ 的记录:

[S]	v	[S]	v
(M)	(纤摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$)	(M)	(纤摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$)
6.25×10^{-6}	15.0	1.00×10^{-3}	74.9
7.50×10^{-5}	56.25	1.00×10^{-2}	75
1.00×10^{-4}	60		

(a) 估算 $V_{\text{最大}}$ 和 K_m ; (b) 在 $[S] = 2.5 \times 10^{-5} M$ 和 $[S] = 5.0 \times 10^{-5} M$ 时, v 会是多大? (c) 在 $[S] = 5.0 \times 10^{-5} M$ 时, 如果酶浓度加倍了, v 会是多大? (d) 上表中给出的 v 是通过测量在 10 分钟期间积累的产物浓度而确定的。证明 v 代表真实的初速度(或“瞬时速度”)。

解:

(a) 获得 $V_{\text{最大}}$ 和 K_m 的最好途径是采用以后叙述的一种数据作图法。然而, 目前我们看到, v 对 $[S]$ 超过 $10^{-3} M$ 以上的变化变得不甚灵敏, 即, 在 $[S] = 10^{-3}$ 至 $10^{-2} M$ 的范围内, v 必然非常接近 $V_{\text{最大}}$ 。

$$V_{\text{最大}} = 75 \text{ 纤摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$$

为解 K_m , 我们可以挑选任一 v 和相应的 $[S]$:

$$\begin{aligned} \frac{v}{V_{\text{最大}}} &= \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \frac{60}{75} = \frac{10^{-4}}{K_m + 10^{-4}} \\ 75 \times 10^{-4} &= 60 K_m + 60 \times 10^{-4} \\ K_m &= \frac{15 \times 10^{-4}}{60} = 0.25 \times 10^{-4} \\ K_m &= 2.5 \times 10^{-5} M \end{aligned}$$

如果该酶遵守 Henri-Michaelis-Menten 方程, 其它任一组的数据理应给出同样的答案。

(b) 在 $[S] = 2.5 \times 10^{-5} M = K_m$ 时, $v = 0.5 V_{\text{最大}}$,

或 $v = 37.5 \text{ 纤摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$

在 $[S] = 5.0 \times 10^{-5} M$ 时,

$$\begin{aligned} \frac{v}{75} &= \frac{5 \times 10^{-5}}{(2.5 \times 10^{-5}) + (5 \times 10^{-5})} = \frac{5}{7.5} \\ v &= \frac{(5)(75)}{7.5} \quad \text{或} \quad v = 50 \text{ 纤摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1} \end{aligned}$$

注意, 当 $[S] = 2K_m$ 时, v 不是 $V_{\text{最大}}$, 虽然当 $[S] = K_m$ 时, v 是 $0.5 V_{\text{最大}}$ 。因我们这里所涉及的不是线性关系而是双曲线关系。

(c) Henri-Michaelis-Menten 方程可以写为

$$v = \frac{[S]}{K_m + [S]} k_p [E]_t$$

于是, 在全底物浓度时, v 与酶浓度成正比。在 $[S] = 5 \times 10^{-5} M$ 时, 加倍了 $[E]_t$, $V_{\text{最大}}$ 就加倍, 因此 v 亦加倍。

$$\therefore v = 100 \text{ 纤摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$$

(d) 只要在试验期内底物浓度基本上保持恒定, 即如只用了一小部分 $[S]$ 时, 该速度可看作是真实的初速度或瞬时速度。在底物浓度相对的比 K_m 高时, 这是不成问题的, 于是, 让我们

在使用最少的[S]时来检验底物消耗情况。表观 v 在 [S] 为 $6.25 \times 10^{-6} M$ 时是 15 纤摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$ ，或换句话说，在 10 分钟内已积累了 150 纤摩尔/升的 P (或已消耗掉 150 纤摩尔的 S)。

$$\frac{\text{用了 } 150 \times 10^{-9} \text{ 摩尔/升的 S}}{\text{原有的 } 6.25 \times 10^{-6} \text{ 摩尔/升的 S}} = \frac{0.150 \times 10^{-6}}{6.25 \times 10^{-6}} = 0.024 \text{ 或 } 2.4\%$$

只用了 2.4% 的 S。凡小于 5% 者是容许的。

例题 4-5

反应 $S \rightleftharpoons P$ 的平衡常数是 5。假定我们有一混合物: $[S] = 2 \times 10^{-4} M$ 和 $[P] = 3 \times 10^{-4} M$, $K_{ms} = 3 \times 10^{-5} M$, $V_{\text{最大正}} = 2$ 微摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$, $V_{\text{最大反}} = 4$ 微摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$ 。(a) 在添加了适当的酶时, 反应会朝哪一个方向进行? (b) 该反应开始走向平衡的初速度是什么?

解:

(a) 现有的 $[P]/[S]$ 比是 1.5, 小于 $K_{\text{平}}$, 因此, 反应会自 S 进行到 P。

(b) 为了计算初始的 $v_{\text{净}}$, 我们需要知道 K_{mP} 。 K_{mP} 可以从 Haldane 方程求得:

$$K_{\text{平}} = \frac{V_{\text{最大正}} K_{mP}}{V_{\text{最大反}} K_{mS}} \quad 5 = \frac{2 K_{mP}}{(4) (3 \times 10^{-5})}$$

$$K_{mP} = 3.0 \times 10^{-4} M$$

$$v_{\text{净}} = \frac{V_{\text{最大正}} \frac{[S]}{K_{mS}} - V_{\text{最大反}} \frac{[P]}{K_{mP}}}{1 + \frac{[S]}{K_{mS}} + \frac{[P]}{K_{mP}}} = \frac{(2) (2 \times 10^{-4}) - (4) (3 \times 10^{-4})}{(3 \times 10^{-5}) - \frac{(4) (3 \times 10^{-4})}{3 \times 10^{-4}}} = \frac{13.33 - 4}{1 + 6.67 + 1} = \frac{9.33}{8.67}$$

$$v_{\text{净}} = 1.08 \text{ 微摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$$

C. 反应级数

如果我们考查一下 v 对 [S] 的曲线, 将会看到有三个性质不同的区域。这三个区域中, 速度是以特有方式 [图 4-8(a)] 与增长的 [S] 相适应的。在底物浓度很低时 (例如 $[S] < 0.01 K_m$), v 对 [S] 的曲线基本上是线性的, 即速度 (实际上) 与底物浓度成正比 [图 4-8(b)]。这就是一级反应动力学区域。在底物浓度很高时 (例如 $[S] > 100 K_m$), 速度基本上与底物浓度无关。这就是零级反应动力学区域 [图 4-8(c)]。在底物浓度居中时, v 和 [S] 间的关系既不遵循一级反应动力学又不遵循零级反应动力学。下面介绍一级和零级区域的特征。

一级反应动力学

当 $[S] \ll K_m$ 时, v 和 [S] 间的线性关系可从 Henri-Michaelis-Menten 方程导出。

$$v = \frac{V_{\text{最大}} [S]}{K_m + [S]}$$

当 $[S] \ll K_m$ 时, 可略去分母上的 [S], 方程简化为

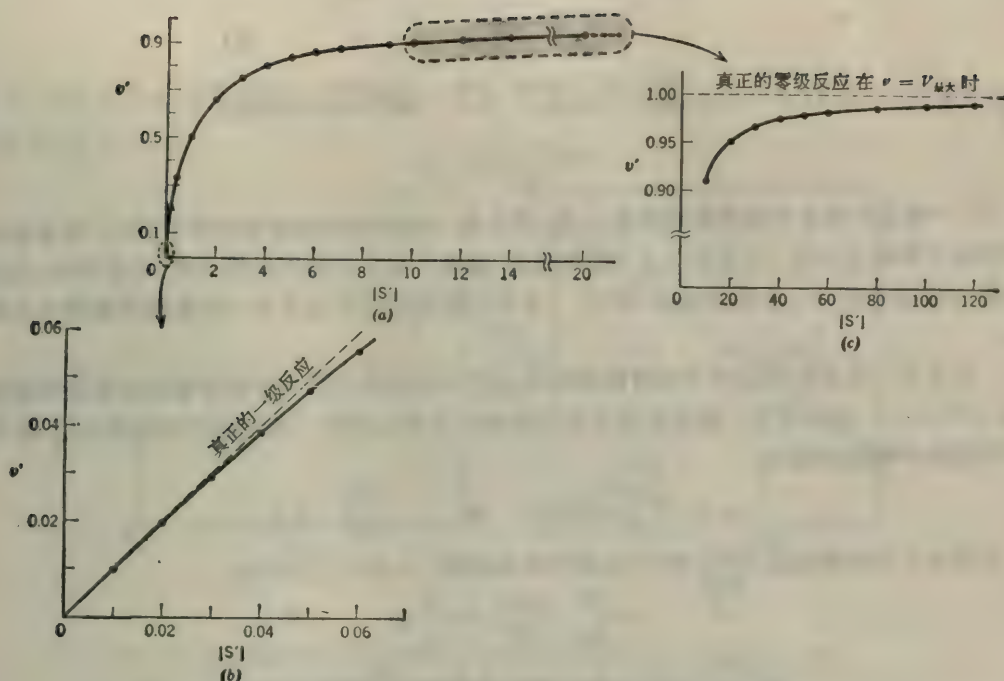


图 4-8 (a) 在 $[S]$ 的广域范围内 v 对 $[S]$ 作图; (b) 在 $[S] \ll K_m$ 的窄域范围内 v 对 $[S]$ 作图; (c) 在 $[S] > K_m$ 的范围内 v 对 $[S]$ 作图。为简便起见, 于 $[S'] = [S]/K_m$ 处绘制 $[S']$ 图, 这与同假定 $K_m=1$ 有同样的结果。

$$v = \frac{V_{\text{最大}}}{K_m} [S] \quad \text{或} \quad v = k[S] \quad (7)$$

式中, k 是总反应的一级速度常数, 如果 v 的单位是以摩尔 \times 升 $^{-1}$ \times 分 $^{-1}$ 和 K_m 是以摩尔/升表示, k 的单位是分 $^{-1}$:

$$k = \frac{V_{\text{最大}}}{K_m} = \frac{\text{摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}}{\text{摩尔} \times \text{升}^{-1}} = \frac{(\text{摩尔})}{(\text{升})(\text{分})} \times \frac{\text{升}}{(\text{摩尔})} = \frac{1}{\text{分}}$$

该方程所表达的事实是: 当 $[S]$ 非常小时, 绝对速度随时跟着 $[S]$ 的减少而减少 [图 4-9(a)]. 然而, 在任一给定的瞬时, 现存底物以一个恒定百分数经转换形成产物:

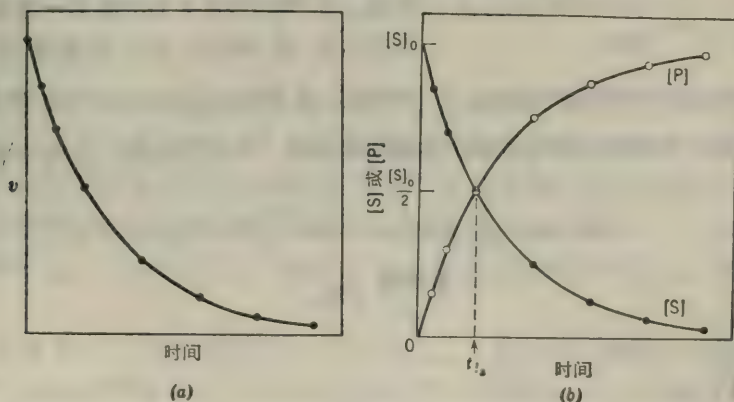


图 4-9 速度曲线的一级反应区域。(a) v 随时间连续地降低; (b) P 的出现和 S 的消失同时间非线性关系。

$$\frac{-d[S]}{dt} = v = k[S]$$

时间每有小量增量
时, S 的利用量... 即速
度... 为某恒定
的百分数... 在该时所存
在的底物

或

$$\frac{-d[S]/[S]}{dt} = k$$

于是, 一级反应速度常数的物理学意义是: 该常数大约等于时间每有小量增量时, 现有底物转变成产物的百分数。\$k\$ 大于 \$1 \text{分}^{-1}\$ 的意思是: 如果 \$v\$ 在 1 分钟内保持不变, 则在零时, 现有底物的利用率会于 1 分钟内超过 100%。表示 \$k\$ 值的单位产生小于一的数值可能更为有意义。

由于在一级反应区域内 \$v\$ 随时间而降低, \$[S]\$ 对时间和 \$[P]\$ 对时间绘制的图形是弯曲的 [图 4-9(b)]。我们可用一级反应速度方程的积分式测定在任一给定的时间范围内底物的利用量和产物的形成量:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = k[S] \quad \text{或} \quad -\frac{d[S]}{[S]} = k dt$$

在任两个不同底物浓度, \$[S]_0\$ 和 \$[S]\$ 以及相应的时间, \$t_0\$ 和 \$t\$ 之间积分:

$$-\int_{[S]_0}^{[S]} \frac{d[S]}{[S]} = k \int_{t_0}^t dt$$

$$\ln \frac{[S]_0}{[S]} = k(t - t_0) \quad \text{或} \quad 2.3 \log \frac{[S]_0}{[S]} = k(t - t_0)$$

如果 \$[S]_0\$ = 初始底物浓度和 \$t_0\$ = 零位时间, 则上述方程可写为

$$2.3 \log \frac{[S]_0}{[S]} = kt \quad (8)$$

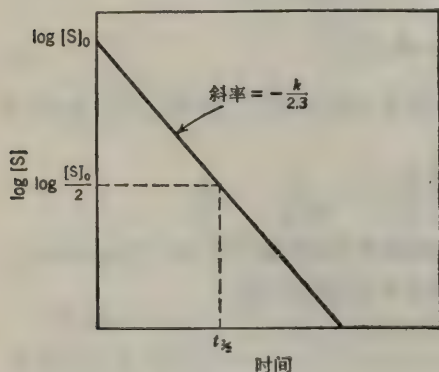


图 4-10 一级反应速度积分方程的半对数曲线。

式中, \$t\$ = 经过的时间;

\$[S]\$ = 在时间 \$t\$ 的底物浓度。

按照指数的形式, 该方程可写为

$$[S] = [S]_0 e^{-kt} \quad (9)$$

方程 (8) 可重新整理为

$$\log [S] = -\frac{k}{2.3} t + \log [S]_0 \quad (10)$$

于是, 以 \$\log [S]\$ 对 \$t\$ 的作图为一 直线, 其斜率为 \$-k/2.3\$, 在 \$\log [S]\$ 轴上的截距为 \$\log [S]_0\$ (图

4-10)。当 \$[S] = \frac{1}{2} [S]_0\$ 时, \$t\$ = “半寿期”, \$t_{1/2}\$。

换言之, \$t_{1/2}\$ 即原有底物的一半转变成产物所需的时间。一级反应的 \$t_{1/2}\$ 为一常数并与 \$k\$ 有关, 如下所示:

$$2.3 \log \frac{1}{0.5} = kt_{1/2} \quad \frac{2.3 \log 2}{k} = t_{1/2} \quad \frac{0.693}{k} = t_{1/2} \quad (11)$$

零级反应动力学

当 \$[S] \gg K_m\$ 时, Henri-Michaelis-Menten 方程分母中的 \$K_m\$ 可以不计, 方程简化为

$$v = \frac{V_{\text{最大}}[S]}{K_m + [S]} \xrightarrow{[S] \gg K_m} \frac{V_{\text{最大}}[S]}{[S]} \quad (12)$$

或

$$v = V_{\text{最大}}$$

实际上, 该速度是恒定的且不受 $[S]$ 的制约 [图 4-11(a)], 以 $[S]$ 对时间和 $[P]$ 对时间的作图是线性的 [图 4-11(b)].

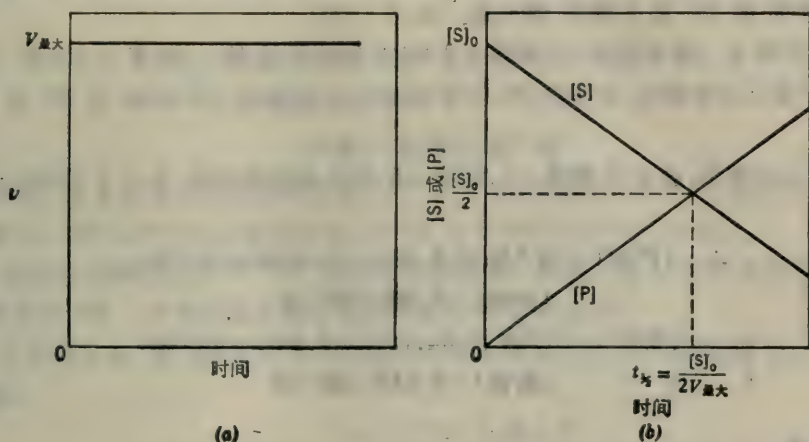


图 4-11 速度曲线的零级反应区域。(a)速度随时间是恒定的; (b) P 的出现和 S 的消失与时间的关系是线性的。

例题 4-6

一酶制剂, 在给定的试验条件下, 其 $V_{\text{最大}}$ 为 $4.6 \text{ 微摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$, 试估算其一级反应速度常数 k 。 $K_m = 2 \times 10^{-6} M$ 。

解:

$$k = \frac{V_{\text{最大}}}{K_m} = \frac{4.6 \times 10^{-6} M \times \text{分}^{-1}}{2 \times 10^{-6} M} = 2.3 \text{ 分}^{-1}$$

或

$$\frac{2.3 \text{ 分}^{-1}}{60 \text{ 秒} \times \text{分}^{-1}} = 0.0383 \text{ 秒}^{-1}$$

于是, 2.3 分^{-1} 的 k 值表示每秒钟酶利用了大约 3.83% 的 $[S]$ 。

例题 4-7

在初始底物浓度为 $10^{-5} M$ 时试验某酶。底物的 K_m 是 $2 \times 10^{-3} M$ 。1 分钟终了时, 有 2% 底物转变成产物。(a) 在 3 分钟终了时, 底物转变成产物的百分数是多少? 3 分钟以后, 产物和底物浓度是多少? (b) 如果初始底物浓度为 $10^{-6} M$, 3 分钟以后将有百分之几的底物转变成产物? (c) 随着酶浓度的不断利用, 可达到的最大速度 ($V_{\text{最大}}$) 是多大? (d) 底物浓度约为多少时, 可观测到 $V_{\text{最大}}$? (e) 在 S 的这一浓度下, 3 分钟内, 底物会有百分之几转变成产物? 解:

(a) 在初始的 S 浓度为 $10^{-5} M$ 时 (该浓度小于 $0.01 K_m$), 反应是一级的——速度与 S 浓度成正比。由于 $[S]$ 随时间持续降低, v 同样也要随时间一同降低。对于一级反应来说, 每单位时间内 (非固定量), 底物以恒定比例转变成产物。我们可用两个方法求解这个问题: 一个

方法是近似法, 即设时间每小量增加时速度是不变的; 而采用精确法应注意的是 v 在不断地变化着。

近似法

在 1 分钟终了时, 利用的底物是 2%, 剩下 98%。在第二分钟期间, 剩下的 98% 的 2% 又被用掉; 98% 的 2% 是 1.96% 多一点。

∴ 到 2 分钟末, 会有 $2\% + 1.96\% = 3.96\%$ 的底物用掉。余下了 $100\% - 3.96\% = 96.04\%$ 。在第三分钟期间, 余下的 96.04% 的 2% 又被用掉; 96.04% 的 2% 是 1.92% 多一点。

∴ 到第三分钟末, 会有 $3.96\% + 1.92\% = 5.88\%$ 的底物用掉。余下了 $100\% - 5.88\% = 94.12\%$ 。

$$\therefore [\text{产物}] = 10^{-5}M \text{ 的 } 5.88\% = 0.0588 \times 10^{-5}M$$

$$[\text{产物}] = 5.88 \times 10^{-7}M$$

$$[\text{底物}] = 10^{-5}M \text{ 的 } 94.12\% = 0.9412 \times 10^{-5}M$$

$$[\text{底物}] = 9.412 \times 10^{-6}M$$

一般原理

在给定的时间间隔内, 底物利用的数量(如通过近似法计算)总会大于实际数值。这是由于我们假定了在一个短的时间间隔内速度是恒定的, 而实际上, 速度是在持续不断地降低。

根据同样的理由, 实际速度常数 k 以分⁻¹表示, 总是大于每分钟底物利用的部分。

精确法

首先计算 k 。已知原始底物在 1 分钟末剩余 98%。

$$2.3 \log \frac{[S]_0}{[S]} = kt$$

令

$$[S]_0 = 100 \quad \text{和} \quad [S] = 98$$

$$2.3 \log \frac{100}{98} = (k)(1)$$

$$2.3(\log 1.02) = k$$

$$2.3(0.009) = k$$

$$k = 0.0207 \text{ 分}^{-1}$$

其次, 计算在 $t = 3$ 分钟时的 $[S]$ 。

$$2.3 \log \frac{100}{[S]} = (0.0207)(3) = 0.0621$$

$$2.3(\log 100 - \log [S]) = 0.0621$$

$$4.6 - 2.3 \log [S] = 0.0621$$

$$-2.3 \log [S] = 0.0621 - 4.60 = -4.54$$

$$\log [S] = \frac{-4.54}{-2.3} = 1.975$$

$$[S] = 1.975 \text{ 的反对数}$$

$$[S] = 94.4$$

$$\text{或 } [S] = \text{原始浓度的 } 94.4\%$$

$$[S] = 0.944 \times 10^{-5} M$$

$$[S] = 9.44 \times 10^{-6} M$$

$$\therefore [\text{产物}] = 100\% - 94.4\% = 5.6\% = 10^{-5} M \text{ 的 } 5.6\% \\ = 0.056 \times 10^{-5} M$$

$$[\text{产物}] = 5.60 \times 10^{-7} M$$

当采用一级反应速度方程的积分形式时, $[S]_0$ 和 $[S]$ 可以百分率(上例中的 100 和 94.4)或以小数(1.0 和 0.944)或以实际浓度($10^{-5} M$ 和 $0.944 \times 10^{-5} M$)来表示。

(b) 如果初始的底物浓度是 $10^{-6} M$, 则该反应仍然是一级的。经 3 分钟, 底物转变成产物的部分仍然是 5.6%。产物形成的数量当然要比在(a)部分的少。

(c) $V_{\text{最大}}$ 可估算出来, 因为我们已知 K_m 和在给定的底物浓度 $[S]$ 下的初速度(v)。在 $[S] = 10^{-5} M$ 时,

$$v = 10^{-5} M / \text{分的 } 2\%$$

$$10^{-5} M / \text{分的 } 2\% = 2\% \times 10^{-5} \text{ 摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1} \\ = (0.02) (10^{-5} \text{ 摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1})$$

$$v = 2 \times 10^{-7} \text{ 摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$$

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{2 \times 10^{-7}}{V_{\text{最大}}} = \frac{10^{-5}}{(2 \times 10^{-3}) + (10^{-5})} = \frac{10^{-5}}{201 \times 10^{-5}}$$

$$V_{\text{最大}} = \frac{(201 \times 10^{-5}) (2 \times 10^{-7})}{(10^{-5})} = 402 \times 10^{-7} = 40.2 \times 10^{-6}$$

$$V_{\text{最大}} = 40.2 \text{ 微摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$$

(d) 在大约 $100K_m$ 时, 可观测到 $V_{\text{最大}}$ 。

$$100(2 \times 10^{-3} M) = 2 \times 10^{-1} M = 0.2 M$$

$$[S] \simeq 0.2 M$$

(e) 在 $0.2 M$ 时, 该反应实质上是零级的。

$$[\text{产物}] = V_{\text{最大}} \times t = 4.02 \times 10^{-5} \text{ 摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1} \times 3 \text{ 分} \\ = 12.06 \times 10^{-5} M \text{ (在 3 分钟)}$$

$$\frac{12.06 \times 10^{-5} M}{0.2 M} \times 100 = \text{底物转变成产物的 \% 数}$$

$$\frac{12.06 \times 10^{-3}}{2 \times 10^{-1}} \% = 6.03 \times 10^{-2} \% = 0.0603 \%$$

既然我们已知 $V_{\text{最大}}$ 和 K_m , 我们可以得到一级反应速度常数 k 的另一估算。

$$k = \frac{V_{\text{最大}}}{K_m} = \frac{4.02 \times 10^{-5} \text{ 摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}}{2 \times 10^{-3} \text{ 摩尔/升}}$$

$$k = 2.01 \times 10^{-2} \text{ 分}^{-1}$$

例题 4-8

在初始底物浓度为 $2 \times 10^{-5} M$ 时试验了某个酶。6 分钟内有一半底物被利用。底物的 K_m 是 $5 \times 10^{-3} M$ 。计算 (a) k , (b) $V_{\text{最大}}$ 和 (c) 到 15 分钟形成的产物浓度。

解:

$[S] < 0.01 K_m$, \therefore 反应是一级的

$$(a) \quad \frac{0.693}{k} = t_{1/2} \quad \frac{0.693}{k} = 6 \text{ 分钟} \quad k = \frac{0.693}{6}$$

$$k = 0.115 \text{ 分}^{-1}$$

$$(b) \quad k = \frac{V_{\text{最大}}}{K_m} \quad V_{\text{最大}} = (k)(K_m)$$

$$V_{\text{最大}} = (0.115 \text{ 分}^{-1})(5 \times 10^{-3} M) = 0.575 \times 10^{-3} M \text{ 分}^{-1}$$

$$= 0.575 \times 10^{-3} \text{ 摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$$

$$V_{\text{最大}} = 575 \text{ 微摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$$

$$(c) \quad 2.3 \log \frac{[S]_0}{[S]} = kt \quad 2.3 \log \frac{2 \times 10^{-5}}{[S]} = (0.115)(15)$$

$$2.3 \log(2 \times 10^{-5}) - 2.3 \log [S] = 1.725$$

$$2.3 \log [S] = 2.3 \log(2 \times 10^{-5}) - 1.725$$

$$\log [S] = \frac{-10.81 - 1.725}{2.3} = \frac{-12.533}{2.3}$$

$$\log [S] = -5.45 \quad \therefore [S] = 3.55 \times 10^{-6} M$$

$$[P] = [S]_0 - [S] = (2 \times 10^{-5}) - (0.355 \times 10^{-5})$$

$$[P] = 1.645 \times 10^{-5} M$$

D. 酶动力学数据的作图方法

因为 v 对 $[S]$ 的曲线是一条双曲线, 测定 $V_{\text{最大}}$ 是相当困难的, 因此测定 $1/2 V_{\text{最大}}$ 处的 $[S]$ (即 K_m) 也是相当困难的, 为便于测定动力学各常数, 数据通常以下述各直线形式之一的方式作图。

Lineweaver-Burk 的倒数作图法: 以 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图

这一作图法是基于将 Henri-Michaelis-Menten 方程重新整理为线性 ($y = mx + b$) 形式:

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{颠倒: } \frac{V_{\text{最大}}}{v} = \frac{K_m + [S]}{[S]}$$

$$\text{斜乘*}: \frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{\text{最大}}[S]} \quad \text{分项: } \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\text{最大}}[S]} + \frac{[S]}{V_{\text{最大}}[S]}$$

$$\text{或} \quad \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\text{最大}}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{最大}}} \quad (13)$$

于是, 如果我们以 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图, 其斜率 $= K_m/V_{\text{最大}}$ 和在 y 轴上的截距 $= 1/V_{\text{最大}}$ (图 4-12)。我们还可看到, 当 $1/v = 0$ 时, $(K_m/V_{\text{最大}}) \times (1/[S]) = -1/V_{\text{最大}}$, 因而 $1/[S] =$

* 即等式两边分母各乘以 $V_{\text{最大}}$ ——译者注。

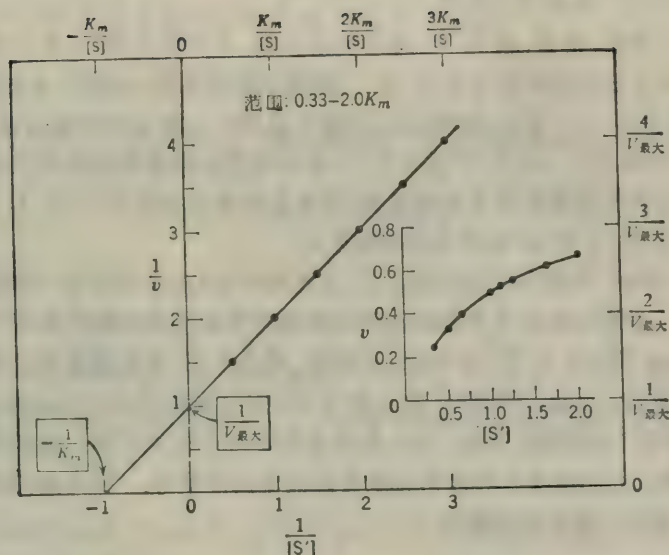


图 4-12 双倒数($1/v$ 对 $1/[S]$)的 Lineweaver-Burk 作图。所选择的 $[S]$ 范围对测定 K_m 和 $V_{\text{最大}}$ 是最适宜的。

$-1/K_m$ 。于是，在 $1/[S]$ 轴上的截距是 $-1/K_m$ 。正如我们以后将看到的，任一因数乘上原始的 Henri-Michaelis-Menten 方程的 K_m 项，会变成倒数方程斜率(即 $K_m/V_{\text{最大}}$)的因数。任一因数乘上原始的 Henri-Michaelis-Menten 方程的 $[S]$ 项，会变成倒数方程中 $1/v$ -轴截距(即 $1/V_{\text{最大}}$)的因数。

底物浓度范围

为了形成倒数曲线，底物浓度应当选择在 K_m 值附近。如果所选择的浓度比 K_m 值高很多，则该曲线基本上是一水平线，这样才能测出 $V_{\text{最大}}$ ，但该曲线的斜率近于零。因此，要精确地测定 K_m 值是困难的。如果所选择的底物浓度比 K_m 值低很多，曲线在两轴上的截距离原点太近，以致无法准确地测定 $V_{\text{最大}}$ 或 K_m [底物浓度很低时，该反应基本上是一级反应，示意(底物)没有饱和， $V_{\text{最大}}$ 和 K_m 看来是无限大的]。

倒数曲线轴的标示

初学者有时不能辨别在标示坐标轴或数据栏中所用的单位，其不能辨别的原因是由于对含有系数的单位有两种解释方法。例如，我们可能看到某表格栏的标题为“底物浓度”以“ $\text{mM} \times 10^2$ ”为单位，在这个标题的下面，我们可能看到数字“0.1”。有些人将标题解释为“数据的单位”，因此，“0.1”就真实地代表了 $0.1 \times 10^2 \text{ mM}$ 或 10 mM 。另一些人将标题解释为“下示数字为已增大 100 倍的 mM 浓度”，于是，数字“0.1”代表的就是 $0.1 \times 10^{-2} \text{ mM}$ 或 0.001 mM 。大多数的生物化学家习惯用后一种。为了避免混乱，最好是将数据简化为不含系数的单位。在上例中，该栏可标成“底物浓度， μM ”，于是， 0.001 mM 就可填写为 1.0。

Lineweaver-Burk 的倒数图是最广泛使用的基本特征图。但是，该图在使用上由于两个原因受到了批评：第一， $[S]$ 的等量增加，在基本的 v 对 $[S]$ 的图中，产生等距点，但在倒数

图中并不产生等距点。例如,在 $[S]$ 的有关值为1, 2, 3, ……10等等时,产生的倒数值趋向于集聚在靠近 $1/v$ 轴处,这样,在 $1/[S]$ 标示轴的上端,只有较少的点;而正是这些点,在标绘我们所要见到的合适的线时更为重要。第二,更重要的批评是,测定 v 时发生的小误差,当取倒数时,就会更加扩大。在低底物浓度(和低 v 值)时, v 测定中的误差很可能是重要的。在高的 $1/v-1/[S]$ 值时,一两个“不适当的”点能对线图的斜率造成显著误差。第一个批评论及的就是包含提供相等倒数增量的试验点,这就意味着必须使用1.00, 1.11, 1.25, 1.43, 1.67, 2.0, 2.5, 3.33, 5和10等有关的底物浓度。

Lineweaver-Burk 倒数作图并不是速度(或配体结合)基本方程唯一的线性变换。实际上,在某些情况下,下述的其它几个线性作图法可能更为合适或可能产生更可靠的动力学常数。例如, Hanes-Woolf 的 $[S]/v$ 对 $[S]$ 作图法,对于在 $[S]$ 等距增量下取得数据可能更方便些。Woolf-Angustinsson-Hofstee 的 v 对 $v/[S]$ 作图法和 Eadie-Scatchard 的 $v/[S]$ 对 v 的作图法都不涉及 v 的倒数,因此,当 v 的误差显著时会较为可靠。这后面两种作图法更多的优点是,提醒人们注意那些与理论关系有重大偏离的诸点。因为这两种作图法的变数都在同一方向上受到 v 的误差的影响。

Hanes-Woolf 作图法: $[S]/v$ 对 $[S]$ 作图

Lineweaver-Burk 方程可重新整理以产生适合于 Hanes-Woolf 作图法的线性方程:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\text{最大}}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{最大}}}$$

方程两边乘以 $[S]$:

$$\frac{[S]}{v} = \frac{[S] K_m}{V_{\text{最大}}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{[S]}{V_{\text{最大}}}$$

或

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{V_{\text{最大}}} [S] + \frac{K_m}{V_{\text{最大}}} \quad (14)$$

于是,以 $[S]/v$ 对 $[S]$ 作图是线性的,其斜率为 $1/V_{\text{最大}}$,在 $[S]/v$ 轴上的截距为 $K_m/V_{\text{最大}}$ 。当 $[S]/v=0$ 时,在 $[S]$ 轴上的截距为 $-K_m$ 。照例,应当注意底物浓度范围的选择。如果底物的浓度范围比 K_m 低很多,图形将接近于水平线;如果底物的浓度范围比 K_m 高很多,曲线将在离原点很近的两轴处相交。Hanes-Woolf 曲线展示于图4-15和图4-33中。

Woolf-Angustinsson-Hofstee 作图法: v 对 $v/[S]$ 作图

整理基本速度方程得另一线性形式,如下所示:

$$v = \frac{V_{\text{最大}}[S]}{K_m + [S]}$$

分子和分母除以 $[S]$:

$$v = \frac{V_{\text{最大}}}{\frac{K_m}{[S]} + 1} \quad V_{\text{最大}} = \frac{v K_m}{[S]} + v$$

$$v = V_{\text{最大}} - \frac{v K_m}{[S]} \quad \text{或} \quad v = -K_m \frac{v}{[S]} + V_{\text{最大}} \quad (15)$$

v 对 $v/[S]$ 的图形是线性的,其斜率为 $-K_m$,在 v 轴上的截距为 $V_{\text{最大}}$ 。当 $v=0$ 时,在 $v/[S]$ 轴上的截距为 $V_{\text{最大}}/K_m$ 。如果底物的浓度范围比 K_m 低很多,曲线会有一个非常陡的斜率,接近一条垂直线交于水平轴上的 $V_{\text{最大}}/K_m$ 处(即反应的一级速度常数)。如果底物浓度范

围比 K_m 高很多, 则曲线会接近于水平线, 并以 $V_{\text{最大}}$ 的高度处于 $v/[S]$ 轴的上方。Woelf-Augustinsson-Hofstee 曲线展示在图 4-14 和图 4-34 中。

Eadie-Scatchard 作图法: $v/[S]$ 对 v 作图

如果按上述 v 对 $v/[S]$ 作图法一样重新整理 Henri-Michaelis-Menten 方程, 我们得到

$$V_{\text{最大}} = \frac{vK_m}{[S]} + v$$

方程两边除以 K_m :

$$\frac{V_{\text{最大}}}{K_m} = \frac{v}{[S]} + \frac{v}{K_m} \quad \text{或} \quad \frac{v}{[S]} = -\frac{1}{K_m} v + \frac{V_{\text{最大}}}{K_m} \tag{16}$$

于是, $v/[S]$ 对 v 的图形是线性的, 其斜率为: $-1/K_m$, 并在 $v/[S]$ 轴上的截距为 $V_{\text{最大}}/K_m$ 。当 $v/[S] = 0$ 时, 在 v 轴上的截距是 $V_{\text{最大}}$ 。Eadie-Scatchard 曲线展示于图 4-35 中。

例题 4-9

下列数据取自某酶促反应 $S \longrightarrow P$, 对该底物浓度已留出间隔以便使用任一线性作图法, 以该数据作图并确定 K_m 和 $V_{\text{最大}}$ 。

[S]	v	(S)	v
(M)	(纤摩尔 \times 升 ⁻¹ \times 分 ⁻¹)	(M)	(纤摩尔 \times 升 ⁻¹ \times 分 ⁻¹)
8.33×10^{-6}	13.8	4.00×10^{-5}	40.0
1.00×10^{-5}	16.0	5.00×10^{-5}	44.4
1.25×10^{-5}	19.0	6.00×10^{-5}	48.0
1.67×10^{-5}	23.6	8.00×10^{-5}	53.4
2.00×10^{-5}	26.7	1.00×10^{-4}	57.1
2.50×10^{-5}	30.8	2.00×10^{-4}	66.7
3.33×10^{-5}	36.3		

表 4-1

[S]	v	$1/[S]$	$1/v$	$v/[S]$	[S]/ v
(M) $\times 10^5$	(M \times 分 ⁻¹) $\times 10^9$	(M ⁻¹) $\times 10^{-4}$	(M \times 分 ⁻¹) ⁻¹ $\times 10^{-7}$	(分) ⁻¹ $\times 10^3$	(分) $\times 10^{-3}$
0.833	13.8	12.00	7.24	1.66	0.602
1.00	16.0	10.00	6.25	1.60	0.625
1.25	19.0	8.00	5.26	1.52	0.658
1.67	23.6	6.00	4.24	1.41	0.709
2.00	26.7	5.00	3.74	1.34	0.746
2.50	30.8	4.00	3.25	1.23	0.812
3.00	34.3	3.33	2.91	1.14	0.875
3.33	36.3	3.00	2.75	1.09	0.917
4.00	40.0	2.50	2.50	1.00	1.00
5.00	44.4	2.00	2.25	0.89	1.13
6.00	48.0	1.67	2.08	0.80	1.25
8.00	53.3	1.25	1.88	0.67	1.50
10.00	57.1	1.00	1.75	0.57	1.75
20.00	66.7	0.50	1.50	0.334	2.99

解:

表 4-1 中整理的数据, 适于四种不同线性作图法分析时使用。为了避免在 v 被 $[S]$ 或 $[S]$ 被 v 除时使用单位上出现问题, 所有的浓度一律用容模 (molarity, 体积摩尔浓度) 表示, 所有的速度一律用摩尔每升每分表示。为了简化标绘的数字, 曾适当地移动了小数点。于是, $[S] = 2.50 \times 10^{-5} M$ 可简单地表示为 2.5。表栏标题“(M) $\times 10^5$ ”意思是所示的数字为浓度乘以 10^5 。在 $[S] = 2.50 \times 10^{-5} M$ 时, 所观察到的 v 是 30.8 纤摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$ 或 30.8×10^{-9} 摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$ 。这一数字在标题为 $(M \times \text{分}^{-1}) \times 10^9$ 的下面可简单地表示为 30.8, 即所示的数字是所观察到的 v 的 10^9 倍。对应的 $1/[S] = 1/(2.5 \times 10^{-5}) = 0.400 \times 10^5 =$

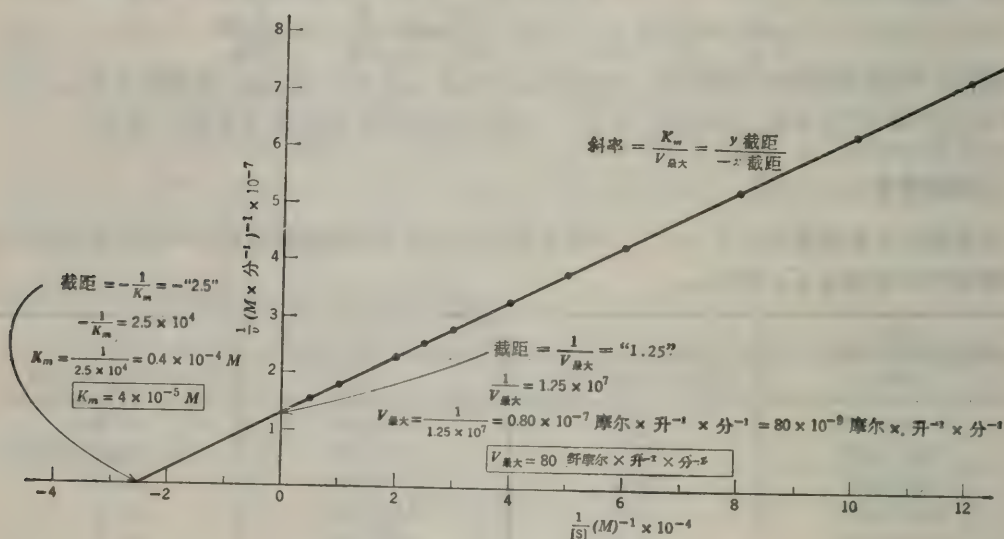


图 4-13 以例题 4-9 中给出的数据, $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图。

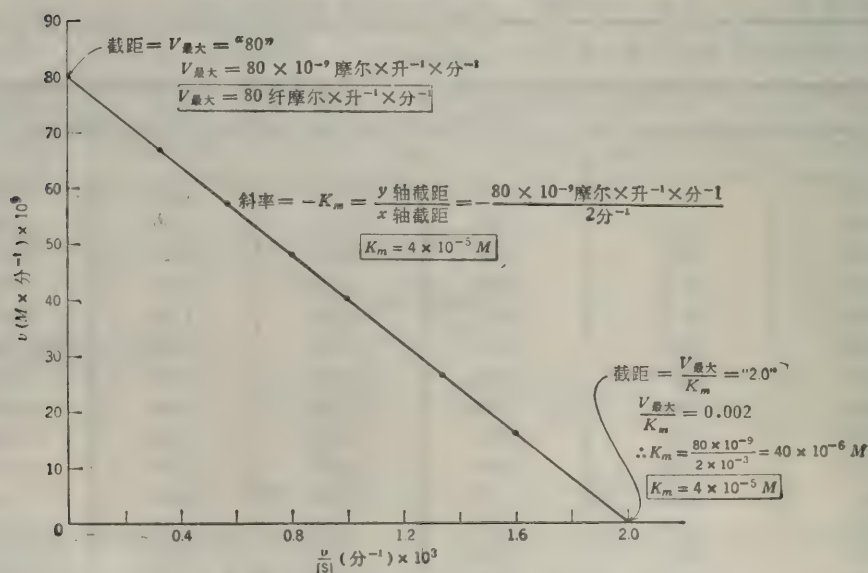


图 4-14 以例题 4-9 中给出的数据, v 对 $v/[S]$ 作图。

4.00×10^4 。在表栏的标题为 $(M^{-1}) \times 10^{-4}$ 下面, 这一数值可简单地填写为 4.00, 即所示的数值是真正的倒数浓度的 10^{-4} 倍。 $1/v = 1/(30.8 \times 10^{-9} \text{ 摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}) = 0.0325 \times 10^9 = 3.25 \times 10^7$, 只填写为 3.25。该表栏标题表示这一栏的数字为真正的倒数速度乘以 10^{-7} 。由于选择了单位, 填入表格中的 $v/[S]$ 和 $[S]/v$ 就是简单的数字。如在 $[S] = 2.5 \times 10^{-5} M$ 和 $v = 30.8 \times 10^{-9} M \times \text{分}^{-1}$ 时, $[S]/v = (2.5 \times 10^{-5}) / (30.8 \times 10^{-9}) = 812$ 分, 这可在表栏标题为 $(\text{分}) \times 10^{-3}$ 下填写为 0.812。 $1/v$ 对 $1/[S]$, $[S]/v$ 对 $[S]$ 和 v 对 $v/[S]$ 的作图展示在图 4-13 至图 4-15 中。 $v/[S]$ 对 v 的作图与用反向轴的 v 对 $v/[S]$ 的作图是相同的。

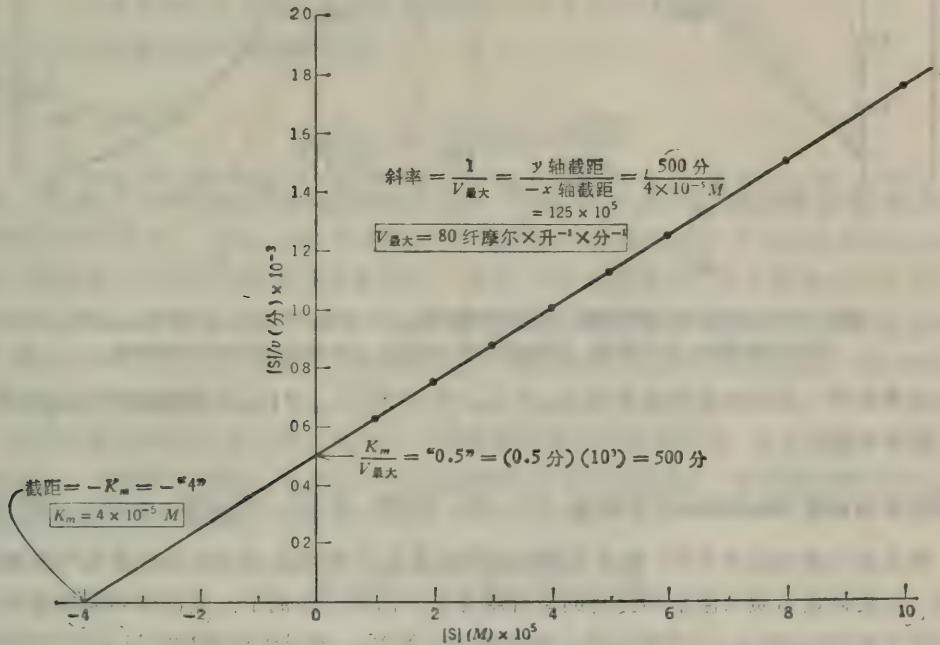


图 4-15 以例题 4-9 中给出的数据, $[S]/v$ 对 $[S]$ 作图。

例题 4-10

血清脂酶活力可用来作为胰脏急性病的一种指示剂。然而, 对数据的解说经常是不可靠的, 因为在一定的三甘油脂存在时, 有活性的脂酶不止一种。哪一种线性作图会最好的揭示出多酶的存在? 为了便于选定, 设血清样品含有两种酶各具有下列动力学常数: $K_{m1} = 1$, $V_{\text{最大}1} = 10$; $K_{m2} = 10$, $V_{\text{最大}2} = 10$ 。

解:

观测到的 $v(v_{\text{总}})$ 应是两种酶活力的总和。

$$v_{\text{总}} = v_1 + v_2 = \frac{[S] V_{\text{最大}1}}{K_{m1} + [S]} + \frac{[S] V_{\text{最大}2}}{K_{m2} + [S]}$$

计算底物浓度宽广范围内的 $v_{\text{总}}$ 。例如, $[S] = 0.1$ 到 $[S] = 25$, 以 $1/v_{\text{总}}$ 对 $1/[S]$, $v_{\text{总}}/[S]$ 对 $v_{\text{总}}$ 等等作图。如果仅存在一种酶, 则所有的曲线应是线性的; 如果存在不止一种酶, 则曲线会脱离线性关系。图 4-16(a) 和图 4-16(b) 展示了这类曲线中的两种。 $v_{\text{总}}/[S]$ 对 $v_{\text{总}}$ 作图明显地表明, 数据并不遵守 Henri-Michaelis-Menten 方程(曲线在较宽范围的各点处弯曲), 这对

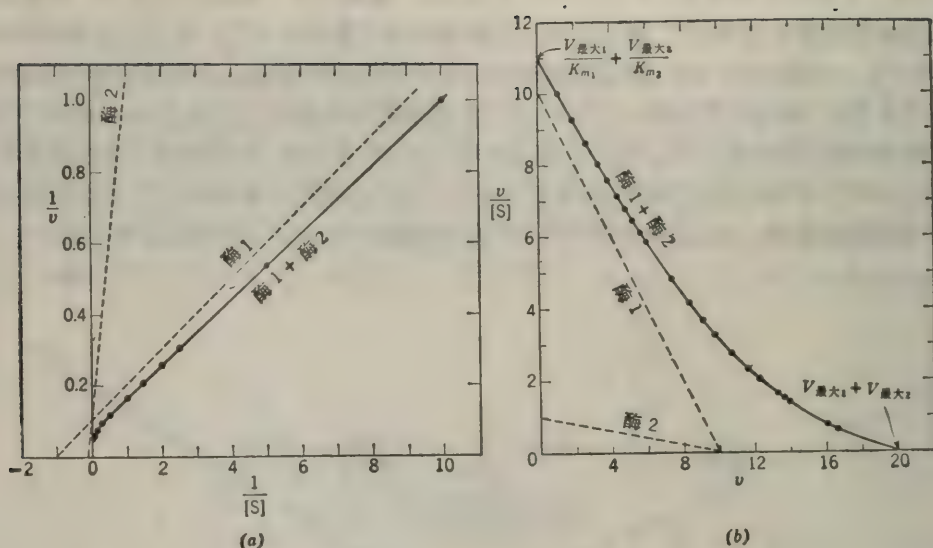


图 4-16 (a) $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图。存在两种酶: $K_{m1}=1$, $V_{\text{最大}1}=10$; $K_{m2}=10$, $V_{\text{最大}2}=10$ 。
 $[S]$ 的作图范围从 0.1 到 25。 (b) $v_{\text{混}}/[S]$ 对 $v_{\text{混}}$ 作图。与叙述在 (a) 中相同的两种酶。

于鉴别催化同一反应的多种酶来说, $v_{\text{混}}$ 对 $v_{\text{混}}/[S]$ 和 $[S]/v_{\text{混}}$ 对 $[S]$ 的作图都比 $1/v_{\text{混}}$ 对 $1/[S]$ 的作图更好些。

平衡结合数据的 Scatchard 作图法: $[S]_b/[S]_f$ 对 $[S]_b$ 或 $[S]_b/[S]_f$ 对 $[S]_b/[E]$, 作图

许多蛋白质结合小分子, 但并不催化配体的反应。如肌红蛋白或血红蛋白与氧的结合和专一性受体蛋白质与激素和药物的结合就是这方面的一些例子。蛋白质和配体的相互作用可用平衡透析(图 4-17)和其它适合的技术进行研究。通过平衡透析法也可以研究底物、

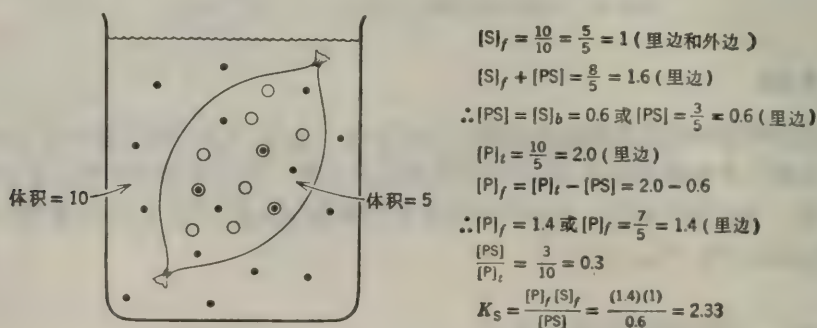


图 4-17 平衡透析实验的简单表示法。其中, 透析袋里外的体积是不相等的。透析袋里面的大圆圈代表非扩散的蛋白质 P, 该蛋白质可以是酶或一种非催化的结合蛋白质。小的圆点代表扩散的配体 S, 该配体可以是底物, 抑制剂或激活剂等等。平衡时, 游离配体的浓度 $[S]_f$ 在膜的两边是相同的。在透析袋里面过量的配体代表结合的配体 $[S]_b$ 或 $[PS]$ 。注意, 如果在透析袋里面没有蛋白质存在, 平衡状态 $[S]_f$ 将是 1.2 (在袋里, $6/5=1.2$, 在袋外, $12/10=1.2$, 或总的 $18/15=1.2$)。为了减少所需要的蛋白质和配体数量, 进行平衡透析经常用特制的、等体积(例如从 0.1 到 10 毫升)的塑料容器, 并由半透膜隔开(参见图 6-2)。

抑制剂和激活剂与酶的结合, 如果酶不催化反应发生的话(倘若一反应需要两个底物, 而只有一个底物存在时, 就用一个底物也是做得到的)。平衡结合的数据通常用 Scatchard 的作图法进行分析。Scatchard 的作图方程可直接导自 K_s 的平衡公式或可由修改 Radio-Scatchard 方程[方程(16)]而取得。修改就是用 $[ES]_b$ 代替 v 和用 $n[E]_t$ 代替 $V_{\text{最大}}$, 因为

$$v \propto [S]_b \quad \text{和} \quad V_{\text{最大}} \propto n[E]_t$$

式中, $[S]_b = [ES]$ = 结合的配体浓度 = 占有部位的浓度,

$[E]_t$ = 总酶浓度,

n = 每个酶分子与相同的和不相同的配体结合部位的数量,

$n[E]_t$ = 配体结合部位的总浓度。

方程变成

$$\frac{[S]_b}{[S]_f} = -\frac{1}{K_s} [S]_b + \frac{n[E]_t}{K_s} \quad (17)$$

式中, K_s 是一个部位的固有的底物解离常数。上述方程的 $[S]_f$ 项代表游离底物浓度(通常只用 $[S]$ 表示)。 $[S]_b/[S]_f$ 代表结合的与游离的底物浓度比。在大多数体外初速度研究中, 酶浓度比底物浓度要低许多数量级。所以, ES 的形成并不会显著地减少 S 的浓度, 因而把游离的底物浓度 $[S]_f$ 同添加的总底物浓度 $[S]$ 看做是相等的这种假设还是稳妥的。在平衡结合的研究中, 必须使用较高的酶浓度, 因此添加的底物中相当大的一部分被结合, 而 $[S]_f$ 会显著的小于 $[S]_b$ 。

以结合配体与游离配体的比值对结合配体的浓度作图是线性的, 其斜率为 $-1/K_s$ [图 4-18(a)]。在横轴上的截距为 $n[E]_t$ (即配体结合部位的总浓度)。如果酶的摩尔浓度是已知的, 数据可用下式作图:

$$\frac{[S]_b}{[S]_f[E]_t} = -\frac{1}{K_s} \frac{[S]_b}{[E]_t} + \frac{n}{K_s} \quad (18)$$

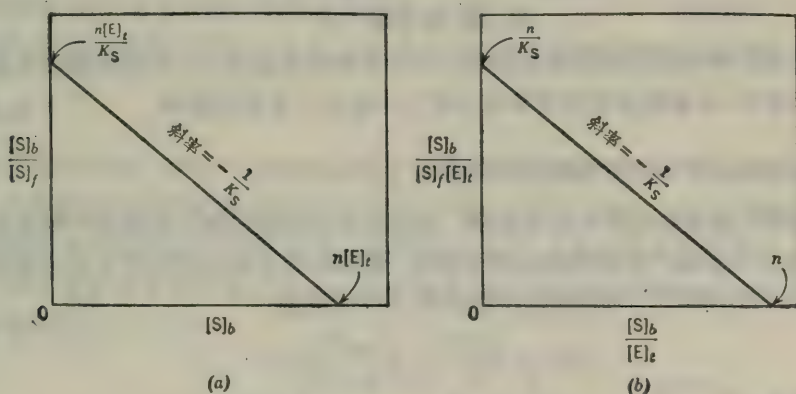


图 4-18 配体平衡结合的 Scatchard 作图。

以 $[S]_b/[S]_f[E]_t$ (即每摩尔酶结合配体的摩尔数除以游离底物浓度)对 $[S]_b/[E]_t$ (即每摩尔酶结合配体的摩尔数)的作图是线性的, 其斜率为 $-1/K_s$ [图 4-18(b)]。在纵轴上的截距为 n/K_s ; 在横轴上的截距是 n , 为每个酶分子配体结合部位的数目。如果酶具有多个独立的、对配体具有不同亲和力的结合部位, 图形将是弯曲的。

例题 4-11

一个氨基酸结合的蛋白质 P (大概与膜的转运和趋药性有关), 通过渗透冲击从大肠杆菌中释放出来. 该蛋白质经纯化至均一性时, 其分子量为 35,000. 将该蛋白质溶液 (0.5 毫克/毫升) 置于透析容器的一个隔室中. 再将等体积的含有 $4 \times 10^{-5} M$ L-亮氨酸- C^{14} 的缓冲液置于另一隔室中. 两室由容许标记的氨基酸随意通过的半透膜隔开, 但是, 蛋白质限制在一个隔室里. 平衡后, 含有蛋白质的隔室中 L-亮氨酸- C^{14} 的总浓度 (结合的 + 游离的) 为 $2.3 \times 10^{-5} M$; 没有蛋白质的隔室中含有 $1.7 \times 10^{-5} M$ 的 L-亮氨酸- C^{14} . 计算 (a) 结合的 L-亮氨酸- C^{14} 的浓度 $[PS]$ 或 $[S]_b$, (b) 游离蛋白质浓度 $[P]_f$, (c) 蛋白质-亮氨酸复合体的解离常数. 解:

首先注意, 透析膜的一侧如果没有蛋白质存在, 两室中, L-亮氨酸- C^{14} 的浓度在平衡后应为 $2 \times 10^{-5} M$.

$$\begin{aligned} (a) \quad [S]_b + [S]_f &= 2.3 \times 10^{-5} \\ [S]_f &= 1.7 \times 10^{-5} \\ \therefore [S]_b = [PS] &= 0.6 \times 10^{-5} M \end{aligned}$$

注意, $[S]_b$ 代表透析容器中一个隔室的结合底物浓度.

(b) 总蛋白质浓度 $[P]_t$ 是

$$[P]_t = \frac{0.5 \text{ 克/升}}{3.5 \times 10^4 \text{ 克/摩尔}} = 1.43 \times 10^{-5} M$$

当每个蛋白质分子只有一个部位时, $[P]_t$ 也就等于结合部位的总浓度. ¹

$$\begin{aligned} [P]_f &= [P]_t - [PS] = (1.43 \times 10^{-5}) - (0.6 \times 10^{-5}) \\ [P]_f &= 0.83 \times 10^{-5} M \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} (c) \quad K_s &= \frac{[P]_f [S]_f}{[PS]} = \frac{(0.83 \times 10^{-5})(1.7 \times 10^{-5})}{(0.6 \times 10^{-5})} \\ K_s &= 2.35 \times 10^{-5} M \end{aligned}$$

图 6-2 表示放射性 S 和蛋白质平衡分布在一个由半透膜隔开的, 二个等体积小室组成的透析容器中. 例题 6-18 举例说明在平衡结合研究中使用了放射性底物.

Henri-Michaelis-Menten 方程的积分形式

在某些条件下测量初速度可能有困难, 虽然在反应过程中测定底物和产物浓度还是可能的. 如果 K_m 很高而产物对酶的亲和力很低, 则随时间而降低的速度只是由酶饱和度的降低而引起的. K_m 和 $V_{\text{最大}}$ 可用速度方程的积分形式测定.

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{\text{最大}}[S]}{K_m + [S]}$$

重新整理并组合为

$$V_{\text{最大}} dt = -\frac{K_m + [S]}{[S]} d[S]$$

在任两个时间 (例如零位时间 t_0 和任一别的时间 t) 和对应的两个底物浓度 ($[S]_0$ 和 $[S]$) 之间积分:

$$V_{\text{最大}} \int_{t_0}^t dt = - \int_{[S]_0}^{[S]} \frac{K_m + [S]}{[S]} d[S]$$

分开右边公式的项:

$$V_{\text{最大}} \int_0^t dt = -K_m \int_{[S]_0}^{[S]} \frac{d[S]}{[S]} - \int_{[S]_0}^{[S]} d[S]$$

或

$$V_{\text{最大}} t = -K_m \ln \frac{[S]}{[S]_0} - ([S] - [S]_0)$$

$$V_{\text{最大}} t = 2.3 K_m \log \frac{[S]_0}{[S]} + ([S]_0 - [S]) \quad (19)$$

式中, $[S]$ = 底物在任一时间 t 的浓度 = $[S]_0 - [P]$,

$([S]_0 - [S])$ = 到时间 t 底物利用的浓度

= P , 到时间 t 产物形成的浓度。

注意, 方程(19)右边的部分是由一级反应项和零级反应项组成的。将方程(19)通除以 t , 重新整理为

$$\frac{2.3}{t} \log \frac{[S]_0}{[S]} = -\frac{1}{K_m} \frac{([S]_0 - [S])}{t} + \frac{V_{\text{最大}}}{K_m} \quad (20)$$

这是一条直线方程。因此, 在反应期间, 通过测量不同时间利用的底物浓度(或形成的产物)就可测出 K_m 和 $V_{\text{最大}}$, 然后, 用适当的数值作图如

图 4-19 所示。

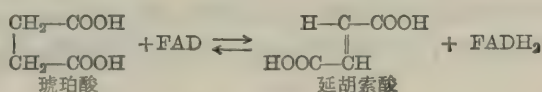
E. 酶的抑制作用

任一种降低酶促反应速度的物质都可看做是“抑制剂”。酶活力的抑制作用是活细胞主要调节方法之一, 也是酶学家最重要的诊断步骤之一。抑制作用的研究经常告诉我们一些有关酶的专一性, 活性部位的物理化学结构以及反应的动力学机制。在我们的日常生活中, 可发觉酶抑制剂充作药物、抗菌素、防腐剂、毒物和毒素。在这一节里, 我们只考查几种简单类型的酶抑制剂。

竞争性抑制

竞争性抑制剂是一种能与游离酶以某种方式相结合而阻止了酶与底物结合的物质。也就是说, 抑制剂与底物相互排斥常是因为对同一部位的真实竞争。竞争性抑制剂可以是真正底物的非代谢类似物或衍生物, 或者是酶的替补底物, 或者是该反应的产物。

丙二酸是理想竞争性抑制剂的一个经典例子。丙二酸抑制催化琥珀酸氧化成延胡索酸的琥珀酸脱氢酶, 如下所示:



丙二酸与琥珀酸相似到足以能和该酶的活性部位结合。

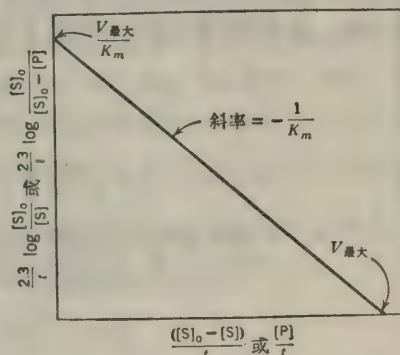
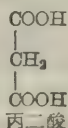


图 4-19 积分的 Henri-Michaelis-Menten 方程曲线。

但是, 丙二酸只有一个亚甲基, 显然不能够发生氧化-还原作用, 而只能发生酶与抑制剂的缔合 (association) 和 EI 复合体的解离。竞争性抑制剂的另一个经典例子是磺胺类药物对-氨基苯磺酰胺。该化合物干扰了叶酸自前体对-氨基苯甲酸 (PABA) 的生物合成。

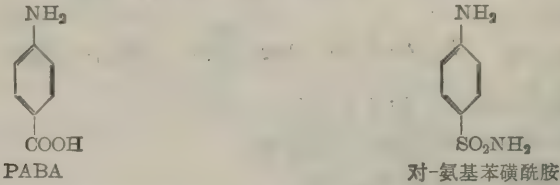


图 4-20 模型 1 说明了经典的抑制剂与底物争夺单个结合部位的竞争性抑制作用。模型 2—4 代表抑制剂和底物可能会是相互排斥的其它方式: 空间位阻 (模型 2); 空间位阻或争夺一个公共结合基团 (模型 3); 和重叠的结合部位 (模型 4)。由和底物结构无关的化合物所引起的“竞争性”抑制的例子是很多的。通常, 抑制剂是代谢途径的最终产物或近似最终产物的物质; 而酶在代谢途径中则是催化一个早期反应 (或一个分支点的反应)。这个现象叫做反馈抑制。抑制剂 (效应物、抑场调节剂或调节剂) 和酶结合的位置与活性部位 (与底物结合的

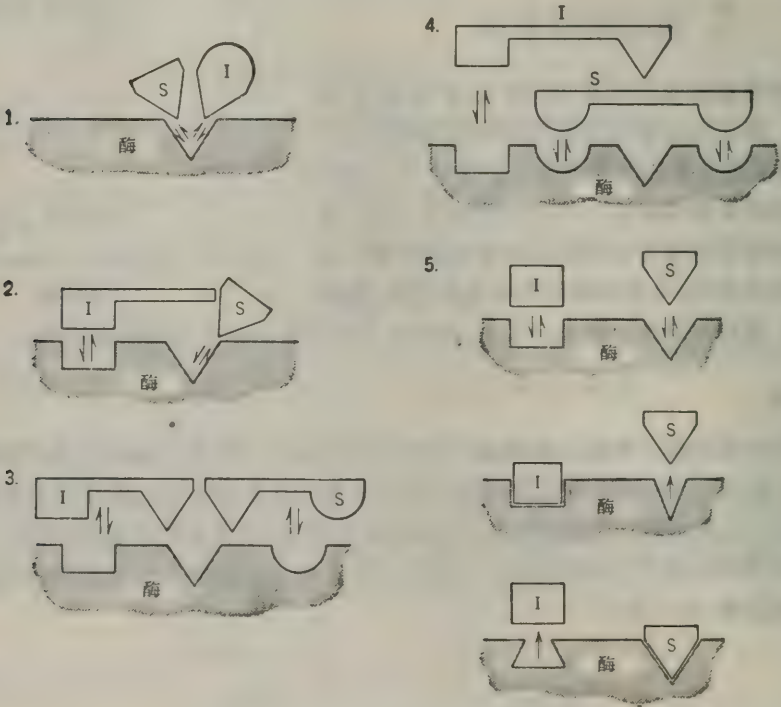
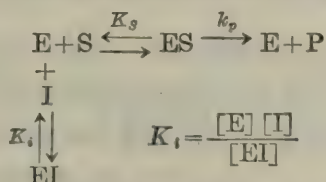


图 4-20 竞争性抑制作用的模型: S 和 I 相互排斥。(1)经典性模型, S 和 I 竞争同一个结合部位, I 必须在结构上与 S 相似。(2)由于空间位阻, I 和 S 相互排斥。(3)I 和 S 共用酶上的一个公共结合基团。(4)I 和 S 的结合部位截然不同,但重叠了。(5)I 与一个明显的抑制剂部位结合引起了酶的构象变化而扭曲或遮盖了其底物结合部位 (反之亦然)。

位置)是不同的。抑制剂与酶的结合引起了酶的构象(三级或四级结构)变化,扭曲了底物的(结合)部位,因而阻止了底物与酶相结合(模型5)。

葡萄糖和ATP之间的己糖激酶催化反应受到果糖或甘露糖的抑制,是一个替补底物的竞争性抑制作用的例子。葡萄糖、果糖和甘露糖都是己糖激酶的底物并都能转变成产物(6-磷酸-己糖)。所有这三种己糖都与酶在同一个活性部位结合,因此,对己糖类中任一种的利用都会因其余二者中任一种的存在而受到抑制。描述“盲端”(dead-end)竞争性抑制的反应图解是



反应的初速度与酶-底物复合体ES的稳态浓度成正比;全部反应是可逆的。因此,我们可以推测,在任一固定的、亚饱和的抑制剂浓度下,(a) v_i (有竞争性抑制剂存在时的速度)可以使之等于 v (不存在抑制剂时的速度),但是,这将需要有较高的底物浓度(为了得到同样的ES浓度),和(b)在非常高的(饱和的)底物浓度下,所有的酶都可使之变成ES形式。因此,在有竞争性抑制剂存在时,最大初速度等于 $V_{\text{最大}}$ (不存在抑制剂时的最大初速度)。在有竞争性抑制剂存在时,表观的 K_m (作为需要 $\frac{1}{2}V_{\text{最大}}$ 时对 $[\text{S}]$ 的测量)会增大,因为在任一抑制剂浓度下,酶的一部分以对S没有亲和力的EI形式存在。速度方程可照通常的方式从快速平衡条件中推导出来。这时,我们认识到酶是分配在三种形式里:

$$v = k_p[\text{ES}] \quad \frac{v}{[\text{E}]_t} = \frac{k_p[\text{ES}]}{[\text{E}] + [\text{ES}] + [\text{EI}]}$$

$$[\text{ES}] = \frac{[\text{S}]}{K_s}[\text{E}] \quad \text{和} \quad [\text{EI}] = \frac{[\text{I}]}{K_i}[\text{E}]$$

$$\therefore \frac{v}{k_p[\text{E}]_t} = \frac{\frac{[\text{S}]}{K_s}[\text{E}]}{[\text{E}] + \frac{[\text{S}]}{K_s}[\text{E}] + \frac{[\text{I}]}{K_i}[\text{E}]}$$

或

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{\frac{[\text{S}]}{K_s}}{1 + \frac{[\text{S}]}{K_s} + \frac{[\text{I}]}{K_i}} \quad (21)$$

如果我们将上述方程与通常的速度方程相比较,我们看到,分母上多了代表EI复合体的 $[\text{I}]/K_i$ 附加项;分子上仍然只有一项,表明只有一种产物形式的复合体(ES)。为了得到一个更熟悉的形式,上述方程右边部分的分子和分母可乘以 K_s 并提公因子:

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[\text{S}]}{K_s \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_i} \right) + [\text{S}]} \quad (22)$$

使用稳态条件我们得到的是同样的最终速度方程,只是以 K_m 代替了 K_s ;这是不足为奇的,因为稳态的假设并不改变未被抑制反应的速度方程的形式,而E和I之间产生EI的反应必须处于平衡。(EI无处可去,只能返回E+I。)该速度方程与通常的Michaelis-Men-

ten 方程的差别是, K_m 项乘一因素 $[1 + ([I]/K_i)]$, 上面的推导证实了我们原来所推测的: $V_{\text{最大}}$ 不受竞争性抑制剂的影响, 但表观 K_m 值增大了. K_m 值的增大并不意味着 EI 复合体对底物有较低的亲和力. EI 对底物完全没有亲和力, 而 E (能与底物结合的唯一形式) 的亲和力并没有变化. K_m 的明显增大是由于所用的酶在“全亲和”和“无亲和”形式间的分配所引起的. 因数 $[1 + ([I]/K_i)]$ 可看做是一个与 $[I]$ 有关的, 描述了酶在 E 和 EI 形式间分配情况的统计学因素. 图 4-21 展示竞争性抑制剂在 v 对 $[S]$ 作图时的效应.

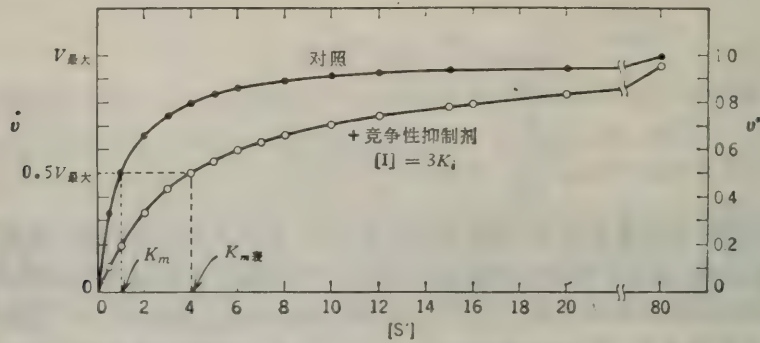


图 4-21 在有与没有竞争性抑制剂的固定浓度下, v 对 $[S]$ 作图.

竞争性抑制作用速度方程的倒数形式是

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\text{最大}}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{最大}}} \tag{23}$$

于是, 曲线的斜率随因数 $[1 + ([I]/K_i)]$ 而增大 (原来的方程乘以 K_m), 但在 $1/v$ 轴上的截

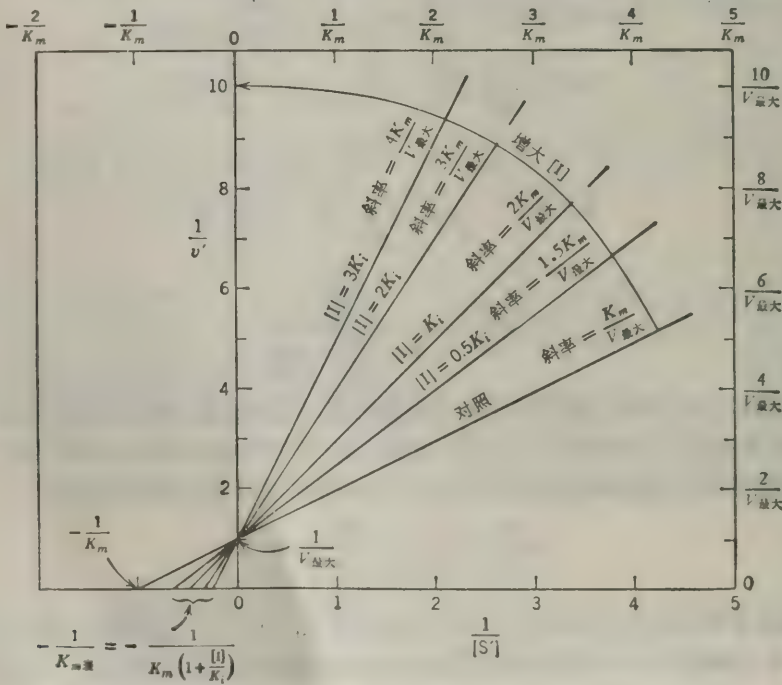


图 4-22 在竞争性抑制剂各种固定的浓度存在时, $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图.

距仍保持 $1/V_{\text{最大}}$ 。 K_i 既可从曲线的斜率,也可从 $1/[S]$ 轴上的截距来计算。当 $1/v=0$ 时, $1/[S]$ 轴上的截距为 $-1/K_{m\text{表}}$ 而 $K_{m\text{表}} = K_m[1 + ([I]/K_i)]$ 。对于每一个抑制剂浓度,可划出一条新的倒数曲线。当 $[I]$ 增大时,“加抑制剂”的曲线斜率就增加(图 4-22)并以逆时针方向围绕着对照曲线交点(在 $1/v$ 轴的 $1/V_{\text{最大}}$ 处)旋转。因为初速度在抑制剂饱和浓度下能趋向于零,曲线的极限将是一条逼近 $1/v$ 轴的垂直线。当 $[I]$ 增大时,在 $1/[S]$ 轴上的截距逐渐移近原点,即 $K_{m\text{表}}$ 持续地增大。

在有竞争性抑制剂存在时,倒数曲线的斜率由下式给出:

$$\text{斜率}_{1/S} = \frac{K_m}{V_{\text{最大}}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad \text{或} \quad \text{斜率}_{1/S} = \frac{K_m}{V_{\text{最大}} K_i} [I] + \frac{K_m}{V_{\text{最大}}} \quad (24)$$

于是,以每一倒数曲线的斜率对相应的抑制剂浓度再作图,得到的将是一条直线[图 4-23(a)]. 为了方便起见,倒数曲线的斜率可直接由纵轴上的截距和横轴上的截距之比(绝对值)读出。 $K_{m\text{表}}$ 也是 $[I]$ 的一个线性函数[图 4-23(b)]:

$$K_{m\text{表}} = \frac{K_m}{K_i} [I] + K_m \quad (25)$$

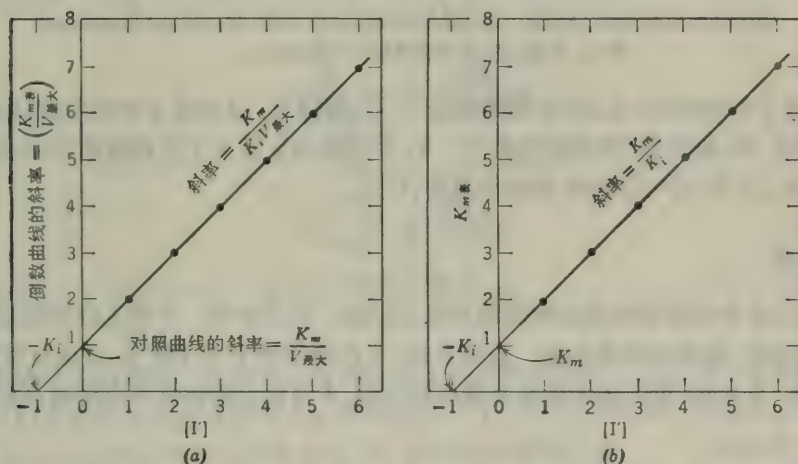


图 4-23 取自倒数曲线数据的再作图。

(a) 斜率 $1/S$ 对 $[I]$; (b) $K_{m\text{表}}$ 对 $[I]$ 。

Dixon 的 $1/v$ 对 $[I]$ 作图法提供了鉴别抑制类型和测定 K_i 的另一方法。该曲线的方程是由倒数曲线的方程通过增加 $\left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right)$ 和重新组合各项而获得。

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\text{最大}} K_i [S]} [I] + \frac{1}{V_{\text{最大}}} \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right) \quad (26)$$

该曲线展示在图 4-24 中,其它的线性作图法展示在图 4-33 至 4-35 中。

一般原理

竞争性抑制剂的作用是增加底物的表观 K_m 值。当 $[I]$ 增加时, $K_{m\text{表}}$ 亦增大, $V_{\text{最大}}$ 保持不变;但是,在有竞争性抑制剂存在时,为了得到任一百分数的 $V_{\text{最大}}$,需要更高的底物浓度。由竞争性抑制剂引起的抑制程度取决于 $[S]$, $[I]$, K_m 和 K_i 。在 $[I]$ 不变的情况下, $[S]$ 的

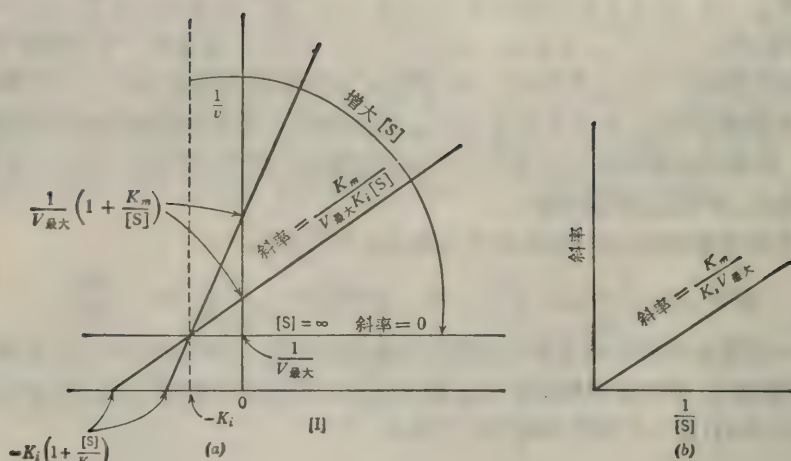
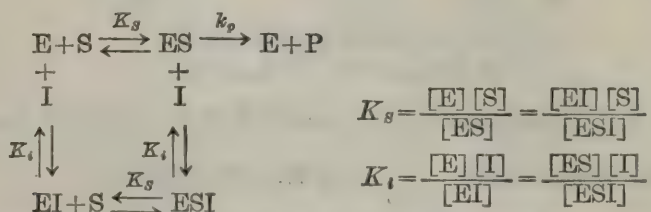


图 4-24 (a) 为竞争性抑制剂的 Dixon 作图法: 在各种固定的底物浓度下, $1/v$ 对 $[I]$ 作图。如果 $V_{\text{最大}}$ 是已知的话, 可直接以 $1/V_{\text{最大}}$ 为高度划出一条水平线。
(b) Dixon 曲线斜率的再作图。线性混合型抑制剂(图 4-32)给出 Dixon 曲线的同样型式。但是, 以此斜率再作图并不通过原点。

增大, 就降低了抑制程度; 在 $[S]$ 不变的情况下, $[I]$ 的增大, 就提高了抑制程度; 在任一给定的 $[S]$ 和 $[I]$ 时, K_i 值越低, 抑制程度越大。 K_i 等于使 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图的斜率增加两倍时的 $[I]$ 浓度 (K_i 不等于产生 50% 抑制作用的 $[I]$)。

非竞争性抑制

经典的非竞争性抑制剂对底物的结合并无影响, 反之亦然。 S 和 I 在不同部位上与酶的结合是可逆的、随机的和独自的。也就是说, I 可结合到 E 和 ES 上; S 也可结合到 E 和 EI 上。但是, 产生的 ESI 复合体是无催化活性的, I 可能妨碍催化中心的适当配置。其平衡状态是



我们可从平衡中看出, 在任一抑制剂浓度下, 底物的无限高浓度不能推动全部的酶都成为可生成产物的 ES 形式。在任一 $[I]$ 时, 酶的一部分将保持不能生成产物的 ESI 复合体状态。因此, 我们可以推测, 在有非竞争性抑制剂存在时的 $V_{\text{最大}}$ ($V_{\text{最大}i}$) 要比所观察到的无抑制剂存在时的 $V_{\text{最大}}$ 为小。非竞争性抑制剂不使 K_m 值(作为 $0.5V_{\text{最大}i}$ 处对 $[S]$ 的测量)变化, 因为在任何抑制剂浓度下, 能与 S 结合的各种酶型(E 和 EI)对 S 有同等的亲和力。非竞争性抑制剂的净效果是表现为好象总酶量有所减少。该速度方程可照通常方法导出。

$$\begin{aligned}
 v &= k_p [\text{ES}] & \frac{v}{[\text{E}]_t} &= \frac{k_p [\text{ES}]}{[\text{E}] + [\text{ES}] + [\text{EI}] + [\text{ESI}]} \\
 [\text{ES}] &= \frac{[\text{S}]}{K_s} [\text{E}] & [\text{EI}] &= \frac{[\text{I}]}{K_i} [\text{E}] \\
 [\text{ESI}] &= \frac{[\text{S}]}{K_s} [\text{EI}] = \frac{[\text{S}][\text{I}]}{K_s K_i} [\text{E}] \\
 \therefore \frac{v}{k_p [\text{E}]_t} &= \frac{\frac{[\text{S}]}{K_s} [\text{E}]}{[\text{E}] + \frac{[\text{S}]}{K_s} [\text{E}] + \frac{[\text{I}]}{K_i} [\text{E}] + \frac{[\text{S}][\text{I}]}{K_s K_i} [\text{E}]} \\
 \frac{v}{V_{\text{最大}}} &= \frac{\frac{[\text{S}]}{K_s}}{1 + \frac{[\text{S}]}{K_s} + \frac{[\text{I}]}{K_i} + \frac{[\text{S}][\text{I}]}{K_s K_i}} \quad (27)
 \end{aligned}$$

$$\text{或} \quad \frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[\text{S}]}{K_s \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_i}\right) + [\text{S}] \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_i}\right)} \quad (28)$$

将速度方程的两边通除以括弧中的因数（即 $1 + \frac{[\text{I}]}{K_i}$ ），我们就可更好地鉴别非竞争性抑制剂的效应：

$$\frac{\frac{v}{V_{\text{最大}}}}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_i}\right)} = \frac{[\text{S}]}{K_s + [\text{S}]} \quad (29)$$

$$\text{或} \quad \frac{v}{V_{\text{最大}i}} = \frac{[\text{S}]}{K_s + [\text{S}]}$$

式中， $V_{\text{最大}i} = \frac{V_{\text{最大}}}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_i}\right)}$ 是在一定的 $[\text{I}]$ 时的表现 $V_{\text{最大}}$ 。

正如所推测的，我们看到，非竞争性抑制剂的仅有效应是降低 $V_{\text{最大}}$ 。 K_s 值保持不变（图 4-25）（学生们不要由于原始方程中 K_s 项乘以 $\left[1 + \left([\text{I}]/K_i\right)\right]$ 而混乱，在决定 K_s 是否受了影响之前，我们必须首先消去任何含变量 $[\text{S}]$ 的因数以修改方程）。 $V_{\text{最大}}$ 的降低并不表示抑制剂已降低了 ES 分解成 E+P 的速度常数，这个常数 k_p 并没有改变。降低的只是 ES 的平衡水平。在任一 $[\text{S}]$ 和 $[\text{I}]$ 下，酶-底物复合体是可以生成产物的 ES 型和不能生成产物的 ESI 型（ESI 复合体的 $k_p=0$ ）的混合状态存在。该因数 $\left[1 + \left([\text{I}]/K_i\right)\right]$ 可看做是一个与 $[\text{I}]$ 相关的统计学因素，它描述了在 ES 型和 ESI 型之间酶-底物复合体的分配情况。经典的非竞争性抑制作用只是在快速平衡条件下获得的，于是， $K_m = K_s$ 。稳态处理并不能得到一种 Henri-Michaelis-Menten 形式的方程，而得到的则是含有自乘项的复杂公式。其倒数曲线从理论上说是非线性的。

倒数方程是

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\text{最大}}} \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_i}\right) \frac{1}{[\text{S}]} + \frac{1}{V_{\text{最大}}} \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_i}\right) \quad (30)$$

该方程指出，斜率和倒数曲线在 $1/v$ 轴上的截距，两者都由于因素 $\left(1 + [\text{I}]/K_i\right)$ 的存在而比“对照”曲线增大。如果斜率和 $1/v$ 轴上的截距都由同一因数而增大，那么，在 $1/v$ 轴上的截

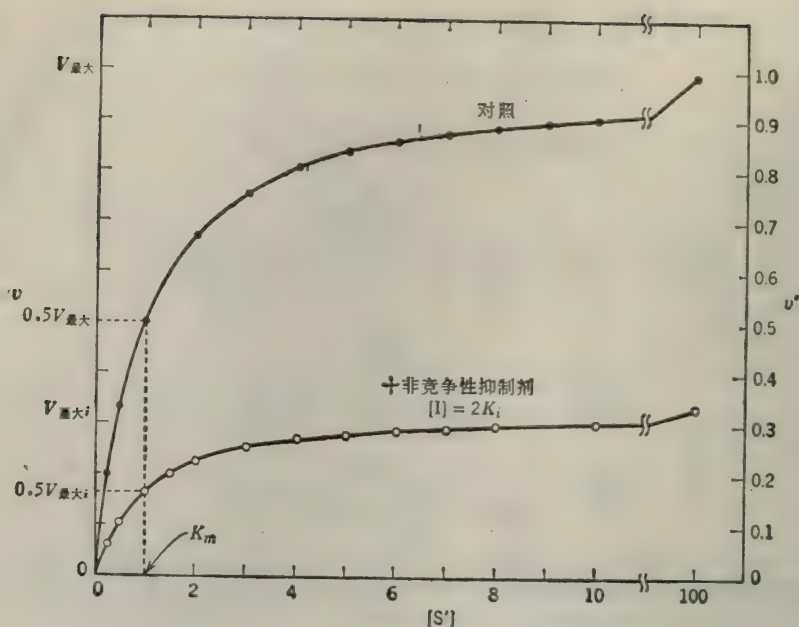


图 4-25 在非竞争性抑制剂存在下, v 对 $[S]$ 作图。

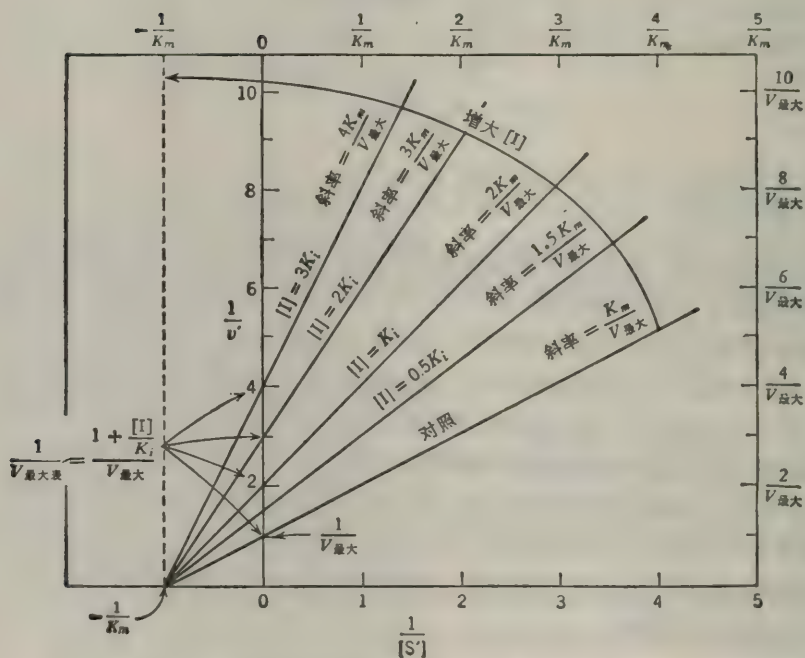


图 4-26 在非竞争性抑制剂各种固定的浓度下, $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图。

距会保持原样(等于 $-1/K_m$)。 K_i 可从斜率或从 $1/v$ 轴上的截距计算出来。对于每个抑制剂浓度可划出一条新的倒数曲线。当 $[I]$ 增大时,“加抑制剂”各曲线的斜率和在 $1/v$ 轴上的截距就增大(图 4-26), 并以逆时针方向在与对照曲线相交点处(在 $1/[S]$ 轴上的 $-1/K_m$

处)旋转。当 $[I]$ 增大时, $1/V_{\text{最大}i}$ 不断地增大, 即 $V_{\text{最大}i}$ 不断地减小。因为在饱和的抑制剂浓度下初速度可趋向于零, 极限斜率会是一条通过 $-1/K_m$ 并与 $1/v$ 平行的垂直线。

如以前对纯竞争性抑制所述的那样, 在有纯的非竞争性抑制剂存在时, 倒数曲线的斜率是 $[I]$ 的一个线性函数。 $1/v$ 轴的截距 ($1/V_{\text{最大}i}$) 也是 $[I]$ 的一个线性函数。如下所示:

$$\frac{1}{V_{\text{最大}}} = \frac{1}{V_{\text{最大}}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad \text{或} \quad \frac{1}{V_{\text{最大}i}} = \frac{1}{V_{\text{最大}}} K_i [I] + \frac{1}{V_{\text{最大}}} \tag{31}$$

于是, 以每一倒数曲线的 $1/V_{\text{最大}i}$ 对相应的抑制剂浓度再作图, 所获得的将是一条直线, 其斜率为 $1/V_{\text{最大}} K_i$, 截距为 $1/V_{\text{最大}}$ ($[I]=0$ 时, 在 $1/V_{\text{最大}i}$ 轴上) 和 $-K_i(1/V_{\text{最大}i}=0$ 时, 在 $[I]$ 轴上)。

非竞争性抑制作用的倒数方程可重新整理成为 Dixon 作图方程:

$$\frac{1}{v} = -\frac{\left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right)}{V_{\text{最大}} K_i} [I] + \frac{1}{V_{\text{最大}}} \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right) \tag{32}$$

该方程的曲线展示在图 4-27 中。非竞争性抑制作用与竞争性抑制作用的不同在于, 所有 $[S]$ 值的曲线在 $[I]$ 轴上的交点都是 $[I] = -K_i$ 。其它的线性作图法展示在图 4-33 至图 4-35 中。

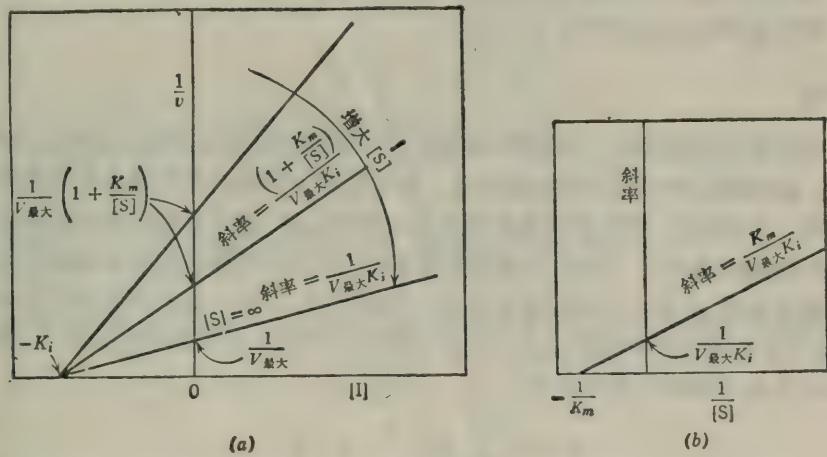
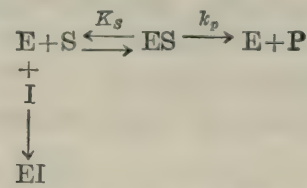


图 4-27 非竞争性抑制剂的 Dixon 作图法: 在底物的各种固定浓度下, $1/v$ 对 $[I]$ 作图。

不可逆抑制

某物质可象一个非竞争性抑制剂与酶不可逆地结合, 虽然 $V_{\text{最大}}$ 降低了, 但 K_m 仍保持不变。该反应是



二异丙基氟磷酸 (DFP) 不可逆地结合到某些水解酶的活性丝氨酸残基上, 就是这类抑制剂的一个例子。 $V_{\text{最大}}$ 降低了, 因为有些酶完全从该系统被消灭 (记住, $V_{\text{最大}} = k_p [\text{E}]_t$)。在

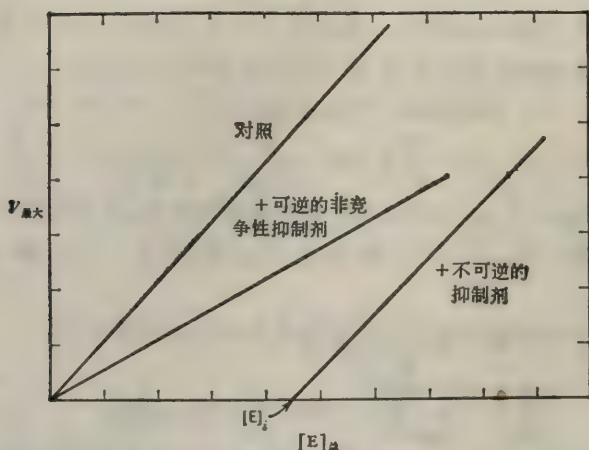
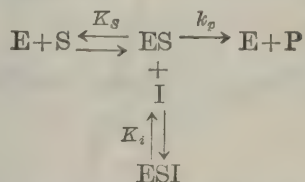


图 4-28 V_{\max} 对添加的总酶量作图,可将一个可逆的和不可逆的非竞争性抑制剂区别开来。[E]_i 代表用不可逆抑制剂所滴定的酶量。

I 的存在下, 通过以 V_{\max} 对添加到实验混合物中的总酶量作图, 可将一个不可逆抑制剂与一个经典的非竞争性抑制剂区别开来 (图 4-28)。

反竞争性抑制

经典的反竞争性抑制剂是一个与酶-底物复合体可逆地结合以产生无活性的 ESI 复合体的化合物。该抑制剂并不与游离的酶结合。纯的反竞争性抑制剂作用在单反应物系统中可能是少见的。尽管如此, 反竞争抑制作用还是值得研究的, 因为它是按一个规定次序相继添加两种酶配体的简单例子。据此所述的类似理由, 反竞争性抑制作用在多反应物系统中是常见的。也就是说, 如果 I 只在底物结合后才与酶结合, I 对于给定的底物来说将是反竞争性的 (虽然 I 很少结合到中间复合体上, 因其所有的底物结合部位都已占满)。经典的反竞争性抑制作用由下列的平衡式描述:



该方程式表明, 在任一 [I] 下, 一个无限高的底物浓度也不会推动所有的酶成为 ES 形式, 总会有一些不能产生产物的 ESI 复合体存在。因此, 我们可以推测, 在反竞争性抑制剂存在下的 V_{\max} ($V_{\max i}$) 将比没有抑制剂存在时的 V_{\max} 为低。但是, 与非竞争性抑制不同, 反竞争性抑制剂使表观 K_m 值降低。这个降低是由于反应 $\text{ES} + \text{I} \rightleftharpoons \text{ESI}$ 用掉了一些 ES, 引起底物结合反应 $\text{E} + \text{S} \rightleftharpoons \text{ES}$ 更进一步向右进行。该速度方程推导如下:

$$\begin{aligned}
 v &= k_p [\text{ES}] & \frac{v}{[\text{E}]_i} &= \frac{k_p [\text{ES}]}{[\text{E}] + [\text{ES}] + [\text{ESI}]} \\
 [\text{ES}] &= \frac{[\text{S}]}{K_s} [\text{E}]
 \end{aligned}$$

和

$$[ESI] = \frac{[I]}{K_i} [ES] = \frac{[S][I]}{K_s K_i} [E]$$

$$\therefore \frac{v}{k_p[E]_t} = \frac{\frac{[S]}{K_s} [E]}{[E] + \frac{[S]}{K_s} [E] + \frac{[S][I]}{K_s K_i} [E]}$$

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{\frac{[S]}{K_s}}{1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[S][I]}{K_s K_i}} \quad (33)$$

或

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[S]}{K_s + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (34)$$

稳态处理可得到用 K_m 代替 K_s 的同样方程。如果我们从变量 $[S]$ 项消去括号内的因数, 方程变为

$$\frac{v}{\frac{V_{\text{最大}}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}} = \frac{\frac{[S]}{K_m}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (35)$$

或

$$\frac{v}{V_{\text{最大}i}} = \frac{[S]}{K_{m\text{表}} + [S]} \quad (36)$$

式中, $V_{\text{最大}i} = \frac{V_{\text{最大}}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$ = 在给定的 $[I]$ 时的表观 $V_{\text{最大}}$ 值,

和 $K_{m\text{表}} = \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$ = 在给定同样的 $[I]$ 时的表观 K_m 值。

换言之, 反竞争性抑制剂降低 $V_{\text{最大}}$ 和 K_m 到同样的程度。 v 对 $[S]$ 作图展示在图 4-29 中。反

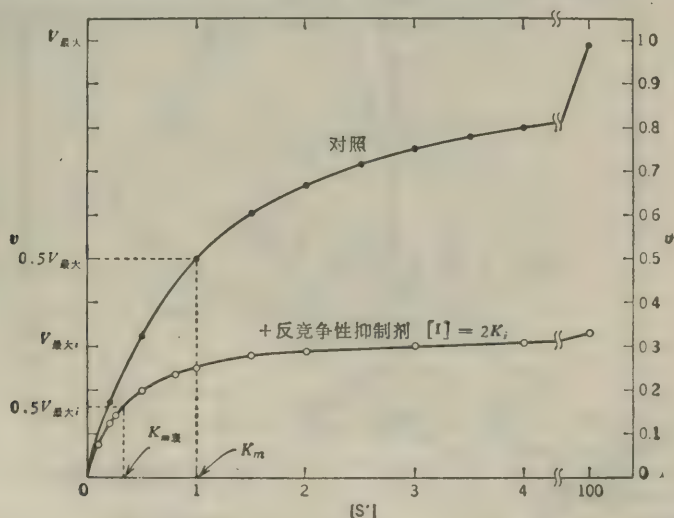


图 4-29 在反竞争性抑制剂存在下, v 对 $[S]$ 作图。

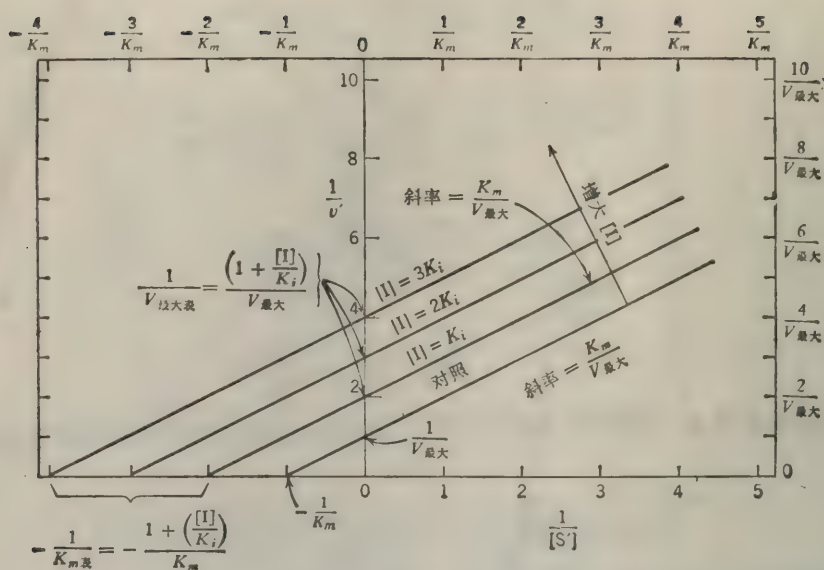


图 4-30 在反竞争性抑制剂的各种固定浓度下, $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图。

竞争抑制作用速度方程的倒数形式是

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad (37)$$

该曲线的斜率仍是 K_m/V_{\max} , 但在 $1/v$ 轴上的截距则按原始方程的 $[S]$ 项乘以因式 $[1 + ([I]/K_i)]$ 而增大。因此, “加抑制剂”的曲线和对照曲线是平行的。当 $[I]$ 增大时, 在 $1/v$ 轴上的截距也就增大, 产生了一系列的平行曲线(图 4-30)。饱和的抑制剂浓度使速度趋于零, 因此, “加抑制剂”曲线距对照曲线位移的增加量是无限的。 $1/V_{\max}$ 对 $[I]$ 的再作图是线性的, 其截距为 $1/V_{\max}$ 和 $-K_i$, 这与非竞争性抑制作用所示的一样, $K_{m表}$ 与 $[I]$ 成反比:

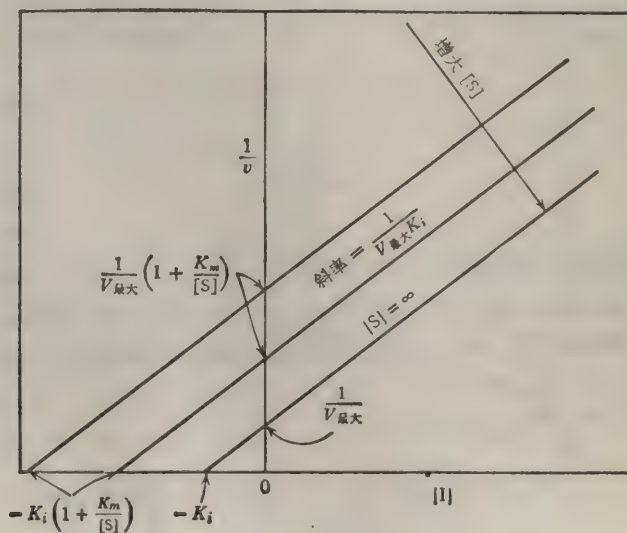


图 4-31 反竞争性抑制剂的 Dixon 作图法: 在 $[S]$ 的各种固定浓度下, $1/v$ 对 $[I]$ 作图。

$$\frac{1}{K_{m\text{表}}} = \frac{1}{K_i K_m} [I] + \frac{1}{K_m} \quad (38)$$

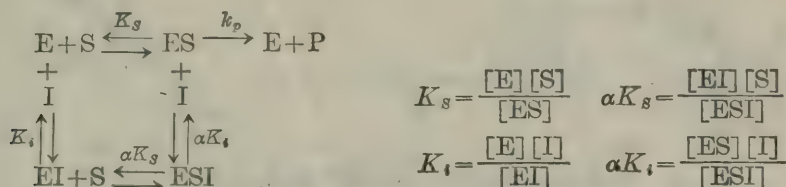
于是, $1/K_{m\text{表}}$ 对 $[I]$ 的再作图将是一条直线, 其斜率为 $1/K_i K_m$, 在 $1/K_{m\text{表}}$ 轴上的截距是 $1/K_m$. 当 $1/K_{m\text{表}}=0$ 时, 在 $[I]$ 轴上的截距为 $-K_i$. Dixon 作图的方程是

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\text{最大}} K_i} [I] + \frac{1}{V_{\text{最大}}} \left(1 + \frac{K_m}{[S]} \right) \quad (39)$$

所示的斜率中不包含 $[S]$ 项, 因此, 曲线族是平行的(图 4-31). 其它的线性作图展示在图 4-33 至图 4-35 中.

线性混合型抑制

以下所示的平衡式代表了混合型抑制作用最简单的图解(实际上是非竞争性抑制剂的一种形式):



由于 I 的存在, 使酶对 S 的解离常数从 K_s 改变为 αK_s . 注意, 作为在平衡状态下存在的四种酶形式, 从 ESI 到 I 的解离常数也必定以 α 因数而变化, 不管经由那条途径, 在 E 和 ESI 之间反应的总 $K_{\text{平}}$ 必定是相同的. 于是, $\text{E} \rightarrow \text{ES} \rightarrow \text{ESI}$ 途径的总 $K_{\text{平}}$ 是 $1/K_s \alpha K_i$, $\text{E} \rightarrow \text{EI} \rightarrow \text{ESI}$ 途径的总 $K_{\text{平}}$ 是 $1/K_i \alpha K_s$ (作为一个类似的情况请参见图 1-11). ESI 是无催化活性的. 快速平衡条件的速度方程可按通常的方式取得:

$$v = k_p [\text{ES}] \quad \frac{v}{[\text{E}]_t} = \frac{k_p [\text{ES}]}{[\text{E}] + [\text{ES}] + [\text{EI}] + [\text{ESI}]}$$

根据以往的经验, 我们可以写出各复合体的项, 而不必推导它们:

$$\frac{v}{[\text{E}]_t} = \frac{k_p \frac{[\text{S}]}{K_s}}{1 + \frac{[\text{S}]}{K_s} + \frac{[\text{I}]}{K_i} + \frac{[\text{S}][\text{I}]}{\alpha K_s K_i}}$$

设 $k_p [\text{E}]_t = V_{\text{最大}}$:

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{\frac{[\text{S}]}{K_s}}{1 + \frac{[\text{S}]}{K_s} + \frac{[\text{I}]}{K_i} + \frac{[\text{S}][\text{I}]}{\alpha K_s K_i}} \quad (40)$$

或

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[\text{S}]}{K_s \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_i} \right) + [\text{S}] \left(1 + \frac{[\text{I}]}{\alpha K_i} \right)} \quad (41)$$

该倒数曲线族与 $1/v$ 轴的左侧相交, 如果 $\alpha > 1$, 相交点在 $1/[\text{S}]$ 轴以上. 以斜率再作图给出 K_i [图 4-32(b)]; 以 $1/v$ 轴的截距再作图给出 αK_i [图 4-32(c)]. 其它的线性作图展示在图 4-33 至图 4-35 中.

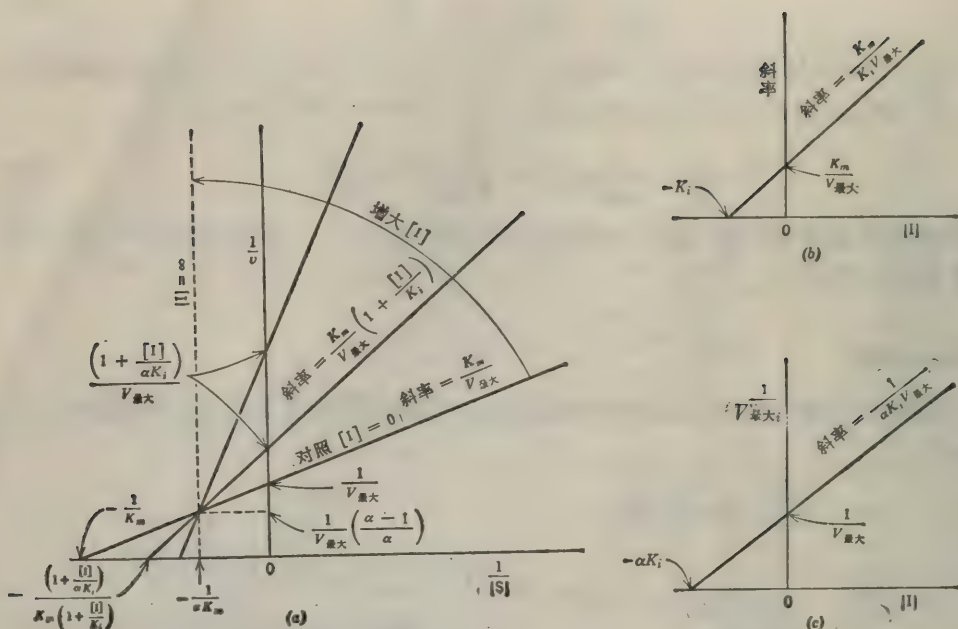


图 4-32 在混合型抑制剂 ($1 < \alpha < \infty$) 的各种固定浓度下, $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图。

ESI 无催化活性, K_m = 在快速平衡条件下的 K_s 。

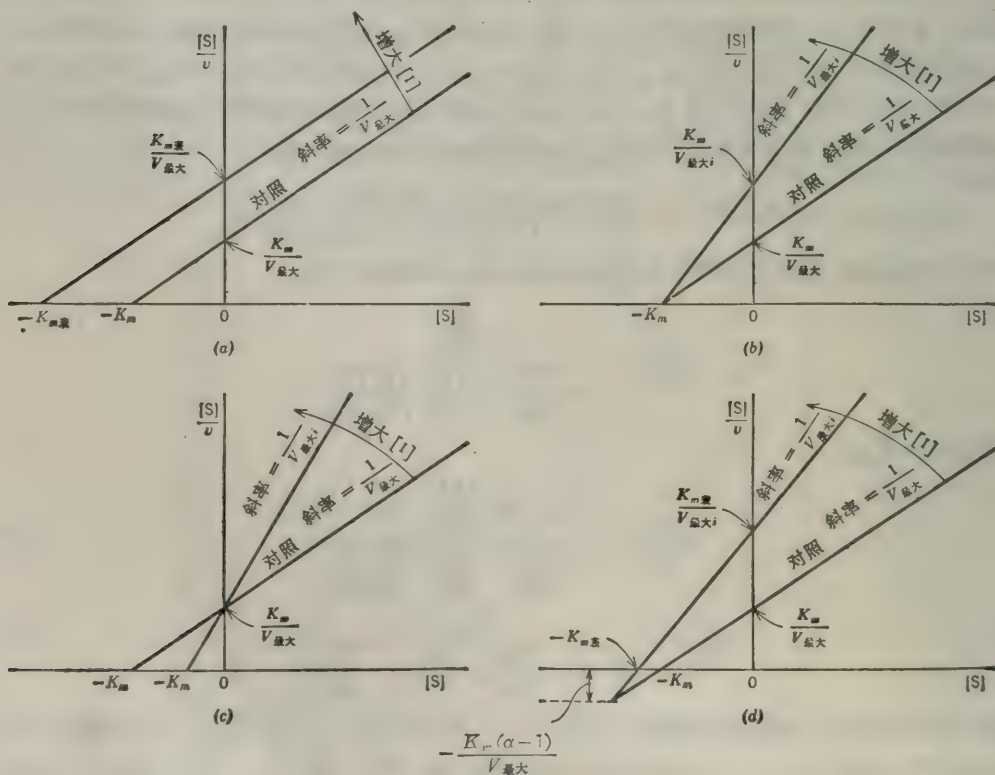


图 4-33 Hanes-Woolf 作图法: $[S]/v$ 对 $[S]$ 作图。(a) 竞争性抑制作用。

(b) 非竞争性抑制作用。(c) 反竞争性抑制作用。(d) 混合型抑制作用。

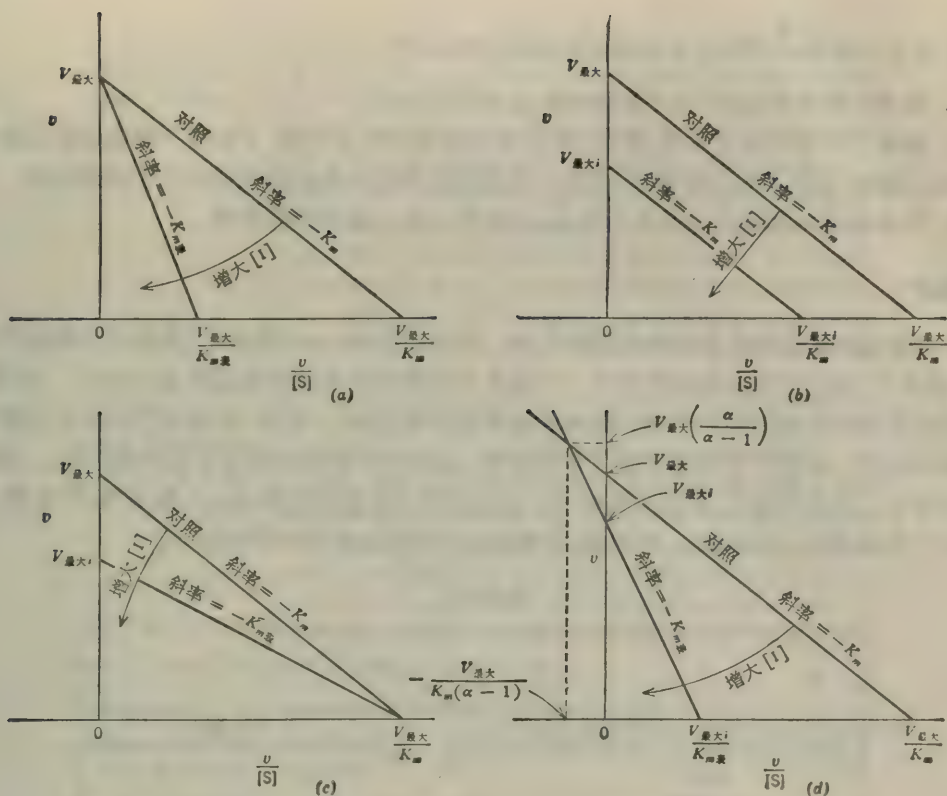


图 4-34 Woolf-Augustinsson-Hofstee 作图法: v 对 $v/[S]$ 作图。(a) 竞争性抑制作用。(b) 非竞争性抑制作用。(c) 反竞争性抑制作用。(d) 混合型抑制作用。

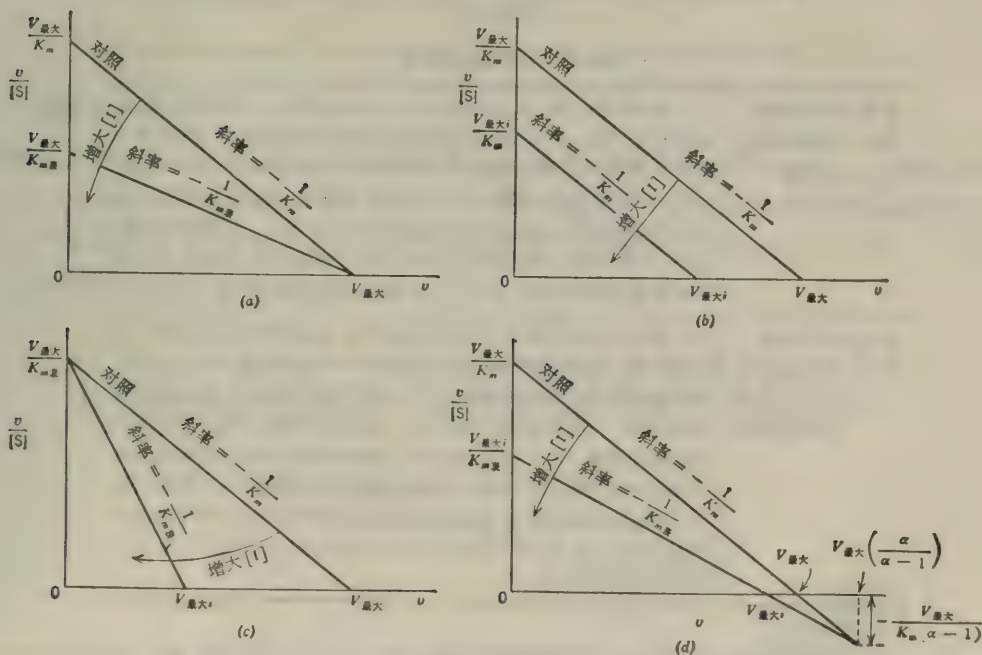


图 4-35 Eadie-Scatchard 作图法: $v/[S]$ 对 v 作图。(a) 竞争性抑制作用。(b) 非竞争性抑制作用。(c) 反竞争性抑制作用。(d) 混合型抑制作用。

没有催化活性的 ESI 的单反应物系统的一般规律

1. 如果 I 和 S 相互排斥, I 就是一种竞争性抑制剂.
2. 如果 I 和 S 不相互排斥, 并且, 两种配体彼此间独立结合, I 就是一种非竞争性抑制剂; 如果 I 影响 E 对 S 的亲和力, I 就是一种用线性斜率和截距再作图的混合型抑制剂.
3. 如果在 S 与酶结合之后 I 才结合, I 就是一种反竞争性抑制剂.

反馈抑制¹⁾

许多生物合成途径是由反馈抑制调节的; 即末端产物(一个或多个)或接近末端的产物(一个或多个)通过抑制合成途径中的一个或多个早期反应来控制代谢流量(flux). 通常, 最大的反馈抑制只能由多个末端产物的联合作用才能达到. 这样, 就避免了在分支生物合成途径中的某一末端产物完全关闭了合成途径, 因此使生物体渴望其它的末端产物. 在下示的途径中, 末端产物 X 可能抑制酶 E_5 ; 末端产物 I 可能抑制酶 E_9 . I 和 X 两者可能如表 4-2 所述的那样, 以协同的、协调的、累集的或相加的方式同时抑制酶 E_1 .

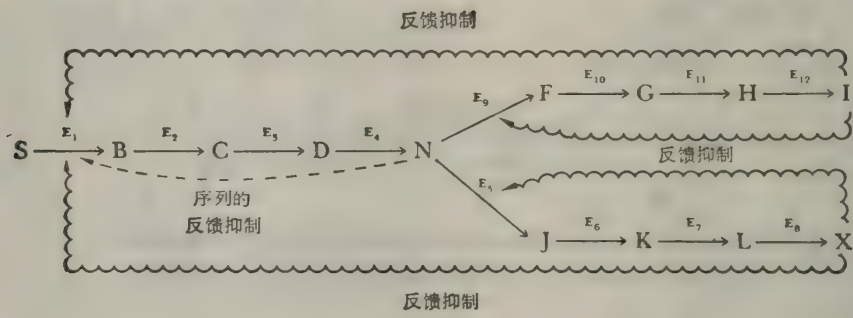


表 4-2 反馈抑制的类型

协同(增效)抑制 实例: 磷酸核糖腺合成酶	每一末端产物 I 和 X 都抑制 E_1 . 在两者中的任一种饱和情况下, 速度可趋于零. I 和 X 的混合物在低浓度下的抑制作用大于单有 I 或单有 X 时的同样总浓度下的抑制作用. 即, 如果在 $[I]=6K_i$, $[X]=0$ 和在 $[X]=6K_x$, $[I]=0$ 时有 35% 的抑制作用, 那末, 在 $[I]=3K_i$ 加 $[X]=3K_x$ 时的抑制作用会大于 35%. 协同抑制的意思是, I 和 X 并不相互排斥, 两者的末端产物能与 E_1 同时地结合并形成盲端(dead-end)产物 EIX 和(或) $EIXS$ 复合体.
协调(多价)抑制 实例: 某些微生物的 β -天冬氨酸(基)激酶	任一单独的末端产物对 E_1 完全不起作用, 但当两者并存时, 酶活力显著降低. 协调抑制可能是协同抑制的一个极端情况: 其中, 一个末端产物的结合可大大提高酶对其它末端产物的亲和力; 即单独 I 在低水平时, 只有很少量的 EI 形成. 在单独 X 低水平时, 只有很少量的 EX 形成. 在 I 加 X 低水平时, 酶的大部分都联合成盲端产物 EIX 和(或) $EIXS$ 复合体. 协调抑制的另一模型如下: EI 和 EX 与 S 的结合就象 E 与 S 的结合一样; EIS 和 EXS 的作用就象与 ES 的作用一样, 但 EIX (只在 I 和 X 并存时形成)不与 S 结合或者 $EIXS$ 无催化活性.

1) 有关不同类型的抑制剂和反馈系统包括局部的和混合型系统(其中, ESI 复合体有催化活性)的完整讨论, 学生们可参考作者的《酶动力学: 快速平衡和稳态酶系统的特性及分析》, Wiley-Interscience(1975).

(续表)

累积(局部)抑制 实例: 谷氨酰胺合成酶	每一末端产物是一个局部的抑制剂。即,单独的 I 或单独的 X 的饱和水平不能使速度趋于零。这意味着, EI 和 EX 能与 S 结合但不及 E 与 S 的结合强(产生了局部竞争性抑制)或 EIS 和 EXS 是有催化活性的,但不如 ES 的活性高(产生局部的非竞争性抑制),或二者兼有之(产生局部混合型抑制)。如果 I 和 X 都是局部的非竞争性抑制剂,则观察到真正的累积抑制。即,如果单独的 I 在给定的浓度下能产生 40% 的抑制作用(剩余 60% 原始活力)和单独的 X 在给定的浓度下能产生 20% 的抑制作用(剩余 80% 的原始活力),那末,同样浓度的 I+X 会剩余 48% [即 60% 原始活力的 80% 并产生 52% 抑制作用(即 $40\% + (60\% \times 20\%)$ 或 $20\% + (80\% \times 40\%) = 52\%$)]。
相加抑制 实例: 某些微生物的聚 β -天冬氨酸(基)激酶	由 I 和 X 引起的真正的相加抑制的意思是,在二个性质不同的酶(或催化部位)存在下,每一种酶只对反馈抑制剂中的一种敏感。于是,单独 I 或单独 X 的饱和水平将产生局部的抑制作用(因为,只有敏感的酶或催化部位受到影响)。I 加 X 的混合物看来象是起增效作用。即,在 $[I] = 3K_i$ 和 $[X] = 3K_x$ 时,所观察到的抑制作用会大于在 $[I] = 6K_i$ 和 $[X] = 0$ 时观察到的抑制作用,或反之亦然。但是,如果 X 在 $6K_x$ 抑制了 35%,而 I 在 $6K_i$ 也抑制了 35%,那么, X 在 $6K_x$ 加上 I 在 $6K_i$ 会正好产生 70% 的抑制作用。上述的其它类型的反馈抑制都不产生相加抑制。
序列抑制 实例: DHAP 合成酶(芳香族氨基酸生物合成途径的 DHAP 合成酶)	末端产物 I 只抑制 E_0 ; 末端产物 X 只抑制 E_5 。当 I 和 X 两者在高水平时,利用 N 的两个途径都受到抑制, N 的浓度因而累积, N 抑制了 E_1 。

例题 4-12

某酶的 K_m 为 $4.7 \times 10^{-5} M$, 如果该制品的 $V_{\text{最大}}$ 是 22 微摩尔 \times 升 $^{-1}$ \times 分 $^{-1}$, 在底物浓度为 $2 \times 10^{-4} M$ 和在 (a) 竞争性抑制剂, (b) 非竞争性抑制剂, (c) 反竞争性抑制剂的浓度皆为 $5 \times 10^{-4} M$ 的情况下, 其反应速度将是多大? K_i 在这三种情况下都是 $3 \times 10^{-4} M$ 。 (d) 这三种情况的抑制程度有多大?

解:

$$\begin{aligned}
 \text{(a)} \quad v_i &= \frac{[S] V_{\text{最大}}}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} = \frac{(2 \times 10^{-4}) (22)}{(4.7 \times 10^{-5}) \left(1 + \frac{5 \times 10^{-4}}{3 \times 10^{-4}}\right) + (2 \times 10^{-4})} \\
 &= \frac{44 \times 10^{-4}}{(4.7 \times 10^{-5}) (2.67) + (2 \times 10^{-4})} = \frac{44 \times 10^{-4}}{3.25 \times 10^{-4}} \\
 v_i &= 13.54 \text{ 微摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{(b)} \quad v_i &= \frac{[S] V_{\text{最大}}}{([S] + K_m) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} = \frac{(2 \times 10^{-4}) (22)}{[(2 \times 10^{-4}) + (4.7 \times 10^{-5})] \left(1 + \frac{5 \times 10^{-4}}{3 \times 10^{-4}}\right)} \\
 &= \frac{44 \times 10^{-4}}{(2.47 \times 10^{-4}) (2.67)} = \frac{44 \times 10^{-4}}{6.59 \times 10^{-4}}
 \end{aligned}$$

$$v_i = 6.68 \text{ 微摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$$

$$\begin{aligned} \text{(c)} \quad v_i &= \frac{[S] V_{\text{最大}}}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} = \frac{(2 \times 10^{-4}) (22)}{(4.7 \times 10^{-5}) + (2 \times 10^{-4}) \left(1 + \frac{5 \times 10^{-4}}{3 \times 10^{-4}}\right)} \\ &= \frac{44 \times 10^{-4}}{(4.7 \times 10^{-5}) + (2 \times 10^{-4}) (2.67)} = \frac{44 \times 10^{-4}}{5.81 \times 10^{-4}} \\ v_i &= 7.57 \text{ 微摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1} \end{aligned}$$

(d) 在没有抑制剂存在时, 速度 v_0 给定为:

$$\begin{aligned} v_0 &= \frac{[S] V_{\text{最大}}}{K_m + [S]} = \frac{(2 \times 10^{-4}) (22)}{(4.7 \times 10^{-5}) + (2 \times 10^{-4})} = \frac{44 \times 10^{-4}}{2.47 \times 10^{-4}} \\ v_0 &= 17.8 \text{ 微摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1} \end{aligned}$$

我们可以用许多方法来表示抑制程度:

$$a = -\frac{v_i}{v_0} = \text{以小数表示的相对活力}$$

$$a_{\%} = \frac{100 v_i}{v_0} = \text{以百分数表示的相对活力}$$

$$i = \left(1 - \frac{v_i}{v_0}\right) = 1 - a = \text{以小数表示的抑制程度}$$

$$i_{\%} = 100(1 - a) = \text{以百分数表示的抑制程度(“百分抑制”)}$$

于是, 上述的三种抑制剂的抑制程度为:

竞争性抑制剂:

$$a = \frac{v_i}{v_0} = \frac{13.54}{17.8} = 0.76 \quad \text{或原始活力的 } 76\%$$

$$i = 1 - 0.76 = 0.24 \quad \text{或 } 24\% \text{ 抑制}$$

非竞争性抑制剂:

$$a = \frac{6.68}{17.8} = 0.375 \quad \text{或原始活力的 } 37.5\%$$

$$i = 1 - 0.375 = 0.625 \quad \text{或 } 62.5\% \text{ 抑制}$$

反竞争性抑制剂:

$$a = \frac{7.57}{17.8} = 0.425 \quad \text{或原始活力的 } 42.5\%$$

$$i = 1 - 0.425 = 0.575 \quad \text{或 } 57.5\% \text{ 抑制}$$

例题 4-13

当 $[S] = K_m$ 和 $[I] = K_i$ 时, 由竞争性抑制剂所引起的相对活力和抑制程度是多少?

解:

通常, 在有竞争性抑制剂存在下, 相对活力 $a = v_i/v_0$ 给定为

$$a = \frac{v_i}{v_0} = \frac{\frac{[S] V_{\text{最大}}}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}}{\frac{[S] V_{\text{最大}}}{K_m + [S]}} \quad \text{或} \quad a = \frac{K_m + [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (42)$$

以小数表示的抑制 i 是 $1 - a$;

$$\begin{aligned}
 i &= 1 - a = 1 - \frac{K_m + [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} = \frac{K_m + \frac{K_m[I]}{K_i} + [S] - K_m - [S]}{K_m + \frac{K_m[I]}{K_i} + [S]} \\
 &= \frac{K_m[I]}{K_i K_m + K_m[I] + K_i[S]} \\
 i &= \frac{[I]}{K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) + [I]} \quad \text{和} \quad i_{\%} = \frac{100[I]}{K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) + [I]} \quad (43)
 \end{aligned}$$

于是, 当 $[S] = K_m$ 和 $[I] = K_i$ 时:

$$a = \frac{K_m + K_m}{K_m(1+1) + K_m} = \frac{2K_m}{3K_m} = 0.667$$

$$i = 1 - a = 1 - 0.667 = 0.333$$

$$i_{\%} = 100i = 33.3\%$$

或

$$i_{\%} = \frac{100K_i}{K_i(1+1) + K_i} = 33.3\%$$

注意, 计算 a 或 i , 不需要 $V_{\text{最大}}$ 值.

同样的推导产生:

非竞争性抑制:

$$a = \frac{K_i}{K_i + [I]} \quad \text{和} \quad i = \frac{[I]}{K_i + [I]} \quad (44)$$

反竞争性抑制:

$$a = \frac{K_m + [S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{和} \quad i = \frac{[I]}{K_i \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right) + [I]} \quad (45)$$

方程 (43), (44) 和 (45) 告诉我们, 在抑制剂固定的浓度下, 增大底物浓度, (a) 降低了竞争性抑制程度, (b) 不影响非竞争性抑制程度, 和 (c) 增大了反竞争性抑制程度. $[S]$ 的增加对由混合型抑制剂所引起的抑制程度的影响则取决于相互作用因数 α . 在 $\alpha > 1$ 的通常情况下, 当固定 $[I]$ 时, 增大了 $[S]$, 就降低了抑制程度.

例题 4-14

某种海洋微生物含有一种水解葡萄糖-6-硫酸(S)的酶. 化验是基于葡萄糖形成的速度. 该酶在无细胞抽提物中的动力学常数为: $K_m = 6.7 \times 10^{-4} M$ 和 $V_{\text{最大}} = 300$ 纤摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$. 半乳糖-6-硫酸是一个竞争性抑制剂(I). 在 $10^{-5} M$ 半乳糖-6-硫酸和 $2 \times 10^{-5} M$ 葡萄糖-6-硫酸的存在下, v 是 1.5 纤摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$. 计算半乳糖-6-硫酸的 K_i 值.

解:

$$\begin{aligned}
 \frac{v}{V_{\text{最大}}} &= \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad K_{m\text{表}} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \\
 \frac{1.5}{300} &= \frac{(2 \times 10^{-5})}{K_{m\text{表}} + (2 \times 10^{-5})} \\
 1.5 K_{m\text{表}} + 3 \times 10^{-5} &= 600 \times 10^{-5} \\
 1.5 K_{m\text{表}} &= (600 \times 10^{-5}) - (3 \times 10^{-5}) \\
 K_{m\text{表}} &= \frac{597 \times 10^{-5}}{1.5} = 398 \times 10^{-5}
 \end{aligned}$$

$$K_{m表} = 39.8 \times 10^{-4} M$$

$$K_{m表} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) = 39.8 \times 10^{-4}$$

$$6.7 \times 10^{-4} \left(1 + \frac{10^{-5}}{K_i} \right) = 39.8 \times 10^{-4}$$

$$6.7 \times 10^{-4} + \frac{6.7 \times 10^{-9}}{K_i} = 39.8 \times 10^{-4}$$

$$\frac{6.7 \times 10^{-9}}{K_i} = (39.8 \times 10^{-4}) - (6.7 \times 10^{-4}) = 33.1 \times 10^{-4}$$

$$33.1 \times 10^{-4} K_i = 6.7 \times 10^{-9}$$

$$K_i = \frac{6.7 \times 10^{-9}}{33.1 \times 10^{-4}} = 0.202 \times 10^{-5}$$

$$K_i = 2.02 \times 10^{-6} M$$

实际上, 该数据可以由以前叙述过的线性作图法之一进行分析; K_i 可通过一个适当的再作图取得。

例题 4-15

乙二醇在肝脏中可氧化成有毒的乙二酸。引起该多步反应顺序的第一个酶是醇脱氢酶 (ADH)。乙二醇的毒害可通过提供大剂量的 ADH 的真正底物——乙醇来抵消。乙醇可从酶中置换乙二醇。在这种情况下, 当 I 是底物时, S 起抑制剂作用。假定在肝脏中 NAD^+ 固定的浓度下, 乙醇的 K_m 是 $10^{-5} M$, 乙二醇的 K_m 是 $10^{-4} M$ 。让我们假定肝细胞中乙醇和乙二醇的浓度与其在血液中的浓度是相同的 (这是可测的)。通过分析给出乙二醇在血液中的浓度 $= 5 \times 10^{-5} M$ 。(a) 为了用乙二醇抑制 ADH 活力的 95%, 血液中乙醇的浓度应该提高到多少 (从而, 为未变化的乙二醇由尿中排出, 提供了充足的时间)? (b) proinebrium 是一种新药, 对 ADH 起非竞争性抑制剂作用 ($K_i = 2 \times 10^{-6} M$)。为了达到对 ADH 95% 的抑制, proinebrium 需用什么浓度?

解:

(a) 如果我们假定乙醇的 K_i 等于它的 K_m , 那么, 对于得到 95% 的抑制:

$$i\% = \frac{100 [EtOH]^*}{K_{iEtOH} \left(1 + \frac{[EG]}{K_{mEG}} \right) + [EtOH]} = \frac{100 [EtOH]}{10^{-5} \left(1 + \frac{5 \times 10^{-5}}{10^{-4}} \right) + [EtOH]} = 95\%$$

$$95 \times 10^{-5} (1 + 0.5) + 95 [EtOH] = 100 [EtOH]$$

$$142.5 \times 10^{-5} = 5 [EtOH] \quad [EtOH] = 28.5 \times 10^{-5} M$$

$$EtOH = 2.85 \times 10^{-4} M$$

(b) 虽然 v_0 和 v_i 随 $[S]$ 变化, 但对一个非竞争性抑制剂, 其抑制程度与 $[S]$ 无关 [方程 (44)]。于是, 对于达到 95% 的抑制:

$$0.95 = \frac{1.00 [I]}{K_i + [I]} \quad 0.95 K_i + 0.95 [I] = 1.00 [I]$$

$$0.05 [I] = 0.95 K_i \quad [I] = 19 K_i = (19) (2 \times 10^{-6})$$

* 式中 $[EtOH]$ 表示乙醇; $[EG]$ 表示乙二醇——译者注。

$$[I] = 3.8 \times 10^{-5} M$$

如果 proinebrium 是有毒的, 那么, 我们可将它在血液中的浓度降低 19 倍 ($[I] = 2 \times 10^{-6} M$ 时), 其抑制程度仍达到 50%。

F. pH 对酶稳定性和活力的影响

pH 影响酶促反应速度并非意外。酶的活性部位通常是由可解离的基团组成的, 这些可解离的基团必须处于适当的离子形态以便维持活性部位的构象来结合底物或催化反应。此外, 一个或多个底物本身也可能含有可解离的基团, 而且, 只有一种离子形态的底物可与酶结合或经受催化。活性部位的质子移变基团 (prototropic groups) 的 pK 值往往是通过测量与 pH 相关的斜率 $1/v$ 和 $V_{\text{最大}}$ 而测定的。一旦知道了 pK 值, 我们就可对所涉及的基团本性进行有根据的推测。在 pH 对底物结合和催化影响的任一研究中, 必需考虑 pH 对酶的稳定性的影响。图 4-36 所示为酶的 v 对 pH 的实验性曲线 (曲线 A), 其“最适”pH 在 6.8。曲线 A 没有表示出在 pH 大于或小于 6.8 时速度下降的原因。其下降可能是由于底物或酶 (或两者) 形成了一种不适当的离子形态, 或由于酶的失活, 或由于这些影响的组合。曲线 B 表示了 pH 对酶稳定性的影响。我们看到, 酶预先保温在 pH 5 或 pH 8, 对在 pH 6.8 下测量的活力没有影响。因此, 在 pH 6.8 和 8 之间以及在 pH 6.8 和 5 之间活力的下降必定是由于酶和 (或) 底物形成了一种不适当的离子形态。当将酶预先保温在 pH > 8 或 pH < 5 时, 全活力在 pH 6.8 时并未得到回复, 这就表明, 在 pH 大于 8 和 pH 小于 5 时活力下降的部分来自酶的不可逆失活。如曲线 B 所示, 对 pH 稳定性的研究是任一酶的一个最重要的表征。遗憾的是, 常常漏掉了这种研究而仅提供曲线 A 的数据。稳定性曲线 B 可得自将酶在指出的 pH 下, 预温一段时间, 至少要达到通常试验时间那么长。然后在最适 pH 下测量酶活力。酶的 pH 稳定性取决于许多因素, 包括: (a) 温度, (b) 离子强度, (c) 缓冲液的化学性质, (d) 不同的防腐剂 (如甘油, 巯基类化合物) 的浓度, (e) 污染的金属离子浓度, (f) 底物或酶的辅助因子的浓度, 和 (g) 酶浓度。在许多情况下, 底物可使酶以某一形式发生构象变化, 即使酶对 pH 和温度的变性作用的耐受力 (resistant) 提高或是降低。酶本身的浓度也可能是一个因素。在低浓度下, 酶可能解离成较小的低聚物或单体, 其稳定性可能低于原来的低聚物。还必须记住, 在一个与实验中所用的“最适”pH 有显著不同的情况下, 酶可能在长时间内更为稳定。在下面的讨论中, 假定初步的研究已确定了酶在所研究的 pH 范围内是稳定的。

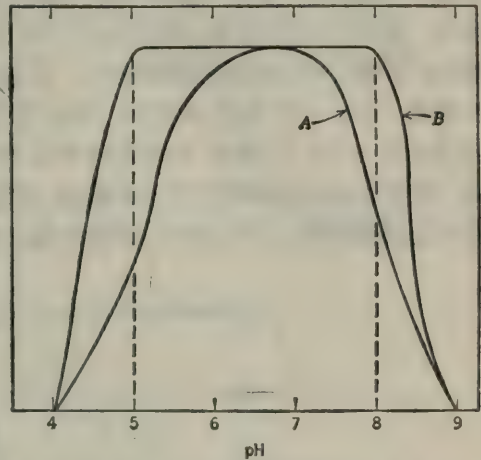


图 4-36 pH 对酶活力和稳定性的影响。曲线 A: v 对 pH 作图。曲线 B: 酶预先保温于指定的 pH 值下, v 在 pH 6.8 下测得。在 pH 6.8 和 5.0 之间以及在 pH 6.8 和 8.0 之间活力的下降是由于 pH 对活性部位的或对底物的离子化基团的影响。在 pH 大于 8.0 和小于 5.0 的活力下降, 则是由于酶的不可逆变性作用。

V 作为 pH 的函数——简单的一元模型

假定有一系统其底物是一个弱酸 HA, 但仅以离子形态 A^- 与酶结合, 那么, 真正的底物就是 A^- . 在固定的总弱酸浓度下, 以适当的离子形态存在的部分可用 Henderson-Hasselbalch 方程计算. 这样, 在 $pH = pK_a$ 时, 总浓度的一半以 A^- 形式存在. 当 pH 超过 pK_a 一个单位时, 总浓度的 10/11 以 A^- 形式存在 (即 $[A^-]/[HA]$ 的比等于 10); 当 $pH = pK_a + 2$ 时, 总浓度的 100/101 以 A^- 形式存在; 当 pH 小于 pK_a 一个单位时, 总浓度的 1/11 以 A^- 的形式存在, 如此等等. 这样, 我们可以认为, 当 pH 增大时, 速度就增大, 如图 4-37 曲线 A 所示, 其中, 假定底物的 pK_a 为 4.0. 但是, 假定酶的活性部位含有一个必须质子化的碱性基团, 以便与带负电荷的底物结合. 以适当离子形态存在的总酶浓度的比例因 pH 的增大而降低, 如图 4-37 曲线 B 所示, 其中, 假定活性部位的 pK_a 为 7.0. 理论上的最大活力应出现在某一 pH 下, 此时, 全部的酶都以 EH^+ 形式存在和全部的底物都以 A^- 形式存在. 但是, 该两个 pK_a 值只差三个 pH 单位, 因此, 这个理论上的最大活力的 pH 处就不存在. 简单的计算将说明, EH^+ 和 A^- 的最大结合值出现在 pH 5.5, 该处 $31.6/32.6 = 97\%$ 的总底

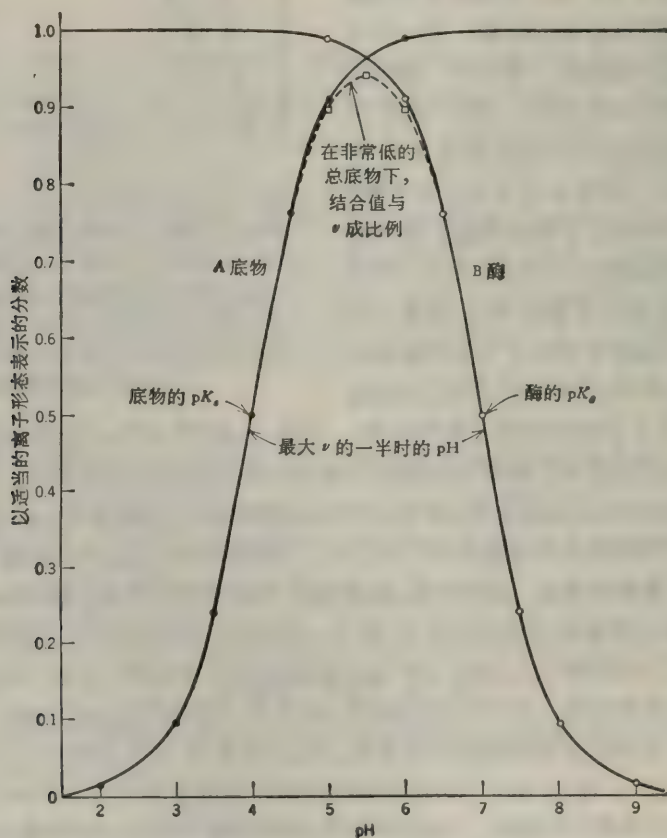


图 4-37 曲线 A: 以适当的离子形态 (A^-) 表示的总底物的分数作为 pH 的函数. 曲线 B: 以适当的离子形态 (EH^+) 表示总酶的分数作为 pH 的函数. 底物的 $pK_a = 4.0$; 酶的 $pK_a = 7.0$. 虚线代表两个分数的乘积, 其在 $[A^-] \ll K_{m,A^-}$ 时与 v 成比例.

因两个 pK_a 远离 (相距 3 个 pH 单位), 在最大 v 一半时的 pH 接近于 pK_a 值.

物和总酶各以适当的离子形态存在。于是,对于所选择的两个 pK_a 值来说,我们只能得到 EH^+ 和 A^- 在理论上最大结合值的 97% 的 97% = 94%。如果酶和底物在作图的 pH 范围内是稳定的,甚至在 pH 5.5 时 A^- 的浓度比 K_m 低很多的话, v 对 pH 的曲线将是由相似的两条曲线相交所形成的曲线,如图 4-37 所示(除最大值会出现在 0.94)。如果酶或底物两者中任一个在两端的 pH 下是不稳定的话,该曲线会比所示的狭窄一些。如果 A^- 的浓度比 K_m 高,则在 pH 5.5 以下曲线不会迅速地降低。例如,如果 $K_m = 10^{-5} M$ 和 $[S]_t = 10^{-3} M$,甚至在 pH 3.0 时, A^- 的浓度仍几乎会是 K_m 的 10 倍。初看起来,测定两个 pK 值作为在最大速度一半时的 pH 值似乎是一件容易的事,然而,只有在两个 pK 值隔离的很远,以致最大速度出现在接近理论最大值时,这样的测定才是可行的。这对于选择诸值以产生图 4-38 是近似合理的。如果 pK 值十分接近,在两个 pK 值均等时,速度仍将是最大的。但是,在最大速度一半时的 pH 值与 pK 值并不相符。

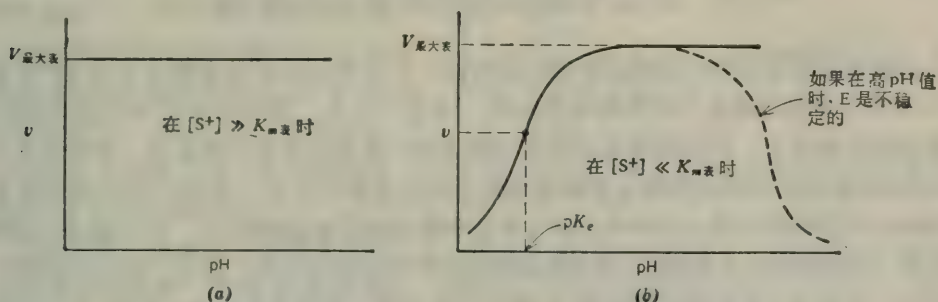


图 4-38 (a)在 $[S^+] \gg K_m$ 时, v 对 pH 作图。(b)在 $[S^+] \ll K_m$ 时, v 对 pH 作图。

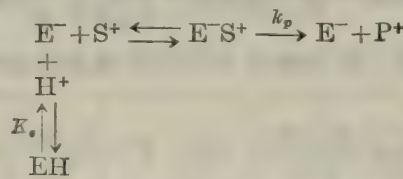
pH 效应的完整分析是十分复杂的,特别是当我们考虑到许多生物化合物具有多个可解离基团以及酶的活性部位也会具有二个或多个可解离基团时,这些可解离基团在结合底物或发生催化作用之前必须以适当的离子形态存在。

例题 4-16

某酶的活性部位含有单个离子化基团,该离子化基团在结合底物和发生催化作用之前必须以阴离子形态存在,该基团的 pK 值是 5.0。底物是一个带阳电荷的化合物并在所研究的 pH 范围内保持完全的离子化。(a)写出反应式表明 pH 对酶种类分配的效应。(b)导出该系统的速度方程。(c) v 对 pH 的作图看起来会是什么样的?

解:

(a) 如果我们以 E^- 表示酶和以 S^+ 表示底物的活性形态,反应是



于是,对这个简单的一元系统, H^+ 作为一种竞争性抑制剂起作用。当 $[H^+]$ 增大(即 pH 降低)时,酶被驱动至无活性的 EH 盲端。

(b) 该速度方程是竞争性抑制剂的普通方程,用 $[H^+]/K_s$ 置换 $[I]/K_i$ 。

$$\frac{V}{V_{\text{最大}}} = \frac{[S^+]}{K_m \left(1 + \frac{[H^+]}{K_o}\right) + [S^+]} \quad \text{和} \quad \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\text{最大}}} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_o}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{最大}}} \quad (46)$$

在不同的 H^+ 固定浓度下, $1/v$ 对 $1/[S^+]$ 的倒数作图将产生不同的 $K_{m\text{表}}$ 值, 从中 K_o (从而 pK_o) 可按通常的方法取得。

(c) 如果 $[S^+]$ 是饱和的 (在所有的 pH 下, 比 $K_{m\text{表}}$ 高很多), 则 $v = V_{\text{最大}}$, 且 $V_{\text{最大}}$ 对 pH 的作图将是一条水平直线 (最适 pH 值不明显) [图 4-38(a)]. 如果 $[S^+]$ 比 $K_{m\text{表}}$ 低, v 将随 pH 的增大 ($[H^+]$ 的降低) 而增大; 于是, 在 pH 值比 pK_o 值高时 (几乎所有的酶都转变成活性 E^- 的形态) 逼近一条直线 [图 4-38(b)]. 如果酶在高 pH 值下是不稳定的, v 可能降低, 给出一个表观的“最适” pH 范围。

G. 温度对酶稳定性和活力的影响

大多数的化学反应在提高温度时速度都加快, T 的增大给予反应物分子以较多的动能, 使其在每单位时间内有较多的有效碰撞。在这一点上, 酶促反应有类似的表现。酶是复杂的蛋白质分子, 它们的催化活力来自精确的、高度有序的三级结构, 该结构把专一的氨基酸 R-基团排列成空间专一性的底物结合部位和催化中心。酶的三级结构主要是由大量弱的非共价键维持的。实际上, 酶分子是非常精细而脆弱的结构。如果酶分子吸收太多的能量, 三级结构会受到破坏, 因而酶会变性, 即失去催化活力。因此, 当温度增高时, 所期望的由于增加 $E+S$ 碰撞而增大的 v , 被变性作用增长的速度所抵销。因此, 以 v 对 T 作图, 通常出现一个有时称为“最适温度”的波峰。“最适温度”取决于选择的试验时间。试验的真正的“最适”温度是它的最高温度; 在该温度下, 酶在一段时间内显示出恒定的活力, 这段时间至少要与试验时间一样长。这个试验是容易做的, 即将酶预温在不同的温度下约一、二倍于试验所需的时间, 然后在一个不致引起酶变性的低温下测其活力。酶的温度稳定性取决于若干因素, 包括 pH 和介质的离子强度以及配体的存在与否。底物常常防止温度变性。由单个多肽链组成的并具有二硫键的低分子量酶类通常比高分子量低聚酶类有更大的热稳定性。一般说来, 在含有高浓度杂蛋白质的粗无细胞制品中酶会有更大的热稳定性 (如果没有蛋白酶存在的话)。

Arrhenius 方程——活化能

反应的速度常数 k 和活化能 E_a 之间的关系由 Arrhenius 方程 (第三章) 给出:

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad \text{或} \quad \log k = -\frac{E_a}{2.3RT} \frac{1}{T} + \log A \quad (47)$$

对个别反应来说 A 是一个常数。以 $\log k$ 对 $1/T$ 作图, 图形是线性的 (图 4-39)。Arrhenius 方程的积分形式是

$$\log \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a}{2.3R} \left(\frac{T_2 - T_1}{T_2 T_1} \right) \quad \text{或} \quad E_a = \frac{2.3RT_2 T_1}{T_2 - T_1} \log \frac{k_2}{k_1} \quad (48)$$

式中, k_2 和 k_1 分别为两个不同温度 T_2 和 T_1 的具体的反应速度常数。

在简单的快速平衡系统中, $V_{\text{最大}}/[E]_t = k_p$ 是一级反应速度常数。因此, 以 $\log V_{\text{最大}}/[E]_t$ 对 $1/T$ 作图得到催化步骤的 E_a 。实际上, 只有 $\log V_{\text{最大}}$ 可以作图, 因为给定制品的

$V_{\text{最大}}$ 与 k_p 是成比例的。因为 K_m 随 T 变化, 所以不能假定给定的底物浓度在所有的温度下都是饱和的。 $V_{\text{最大}}$ 应当在每一温度下从倒数作图中测定才合理。对于大多数的酶促反应来说, $V_{\text{最大}}$ 取决于若干速度常数, 每一速度常数可能随变化的温度而受到不同的影响。结果, 由 Arrhenius 曲线计算出的 E_a 将是一个表观值或“平均”值。如果在不同的温度下, 各个不同的步骤成为速度限定步骤, Arrhenius 曲线本身可能是非线性的。有时候, 在某一温度下 (“转换温度”), 曲线的斜率可能出现一个明显的变化, 在这一温度下, $V_{\text{最大}}$ 随着速度限定步骤的变化而改变 (图 4-39, 曲线 B)。Arrhenius 曲线在低 $1/T$ (高 T) 处突然下降, 表明蛋白质已变性 (图 4-39, 曲线 C)。

温度对反应速度的影响常常用温度系数 Q_{10} 来表示, 即温度每升高 10°C , 反应速度随之相应增加的因素。

$$E_a = \frac{2.3RT_2T_1 \log Q_{10}}{10} \tag{49}$$

在 $25\sim35^{\circ}\text{C}$ 的范围内, Q_{10} 为 2 相当于 E_a 约为 12,600 卡/摩尔。

例题 4-17

温度对 β -半乳糖苷酶对乳糖水解作用的影响如下所示。计算活化能 E_a 和 Q_{10} 。

$T(^{\circ}\text{C})$	$V_{\text{最大}}$ (微摩尔 \times 分 $^{-1} \times$ 毫克蛋白质 $^{-1}$)
20	4.50
30	8.65
35	11.80
40	15.96
45	21.36

解:

获得 E_a 最好的方法是以 $\log V_{\text{最大}}$ 对 $1/T$ 作图, 其中, T 以 $^{\circ}\text{K}$ 表示。数据整理如下:

$T(^{\circ}\text{C})$	$T(^{\circ}\text{K})$	$(1/T) \times 10^3$	$V_{\text{最大}}$	$\log V_{\text{最大}}$
20	293	3.413	4.50	0.653
30	303	3.300	8.65	0.937
35	308	3.247	11.80	1.071
40	313	3.195	15.96	1.203
45	318	3.145	21.36	1.330

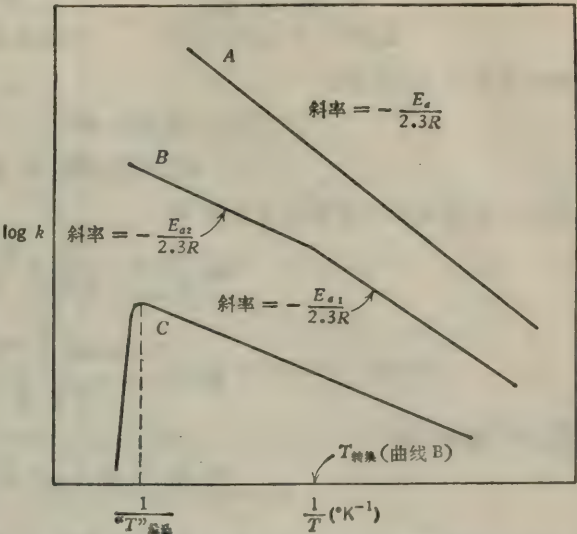


图 4-39 反应的活化能 E_a 可从不同温度下所测量的反应速度常数来测定并以 $\log k$ 对 $1/T$ 作图。对于酶促反应来说, $\log V_{\text{最大}}/[E]$, 或只是 $\log V_{\text{最大}}$ 可以作图, 曲线 A: 普通的作图法。曲线 B: 如果在某一温度下, 有个不同的步骤成为速度限定步骤的话, 此时, 曲线的斜率会出现一个明显的变化。曲线 C: 曲线突然下降, 表明酶已失活。

该曲线的斜率为

$$\frac{1.330 - 0.653}{(3.145 - 3.413) \times 10^{-3}} = \frac{0.677}{-0.268 \times 10^{-3}} = -2.53 \times 10^3$$

该斜率等于 $-E_a/2.3R$

$$\therefore E_a = -2.3(1.98)(-2.53 \times 10^3)$$

$$E_a \approx 11,500 \text{ 卡/摩尔}$$

我们可以直接地从任意两个点计算 E_a :

$$\log \frac{V_{\text{最大}2}}{V_{\text{最大}1}} = \frac{E_a}{2.3R} \left(\frac{T_2 - T_1}{T_2 T_1} \right)$$

$$E_a = \frac{2.3R \log \frac{V_{\text{最大}2}}{V_{\text{最大}1}} T_1 T_2}{(T_2 - T_1)}$$

选择 30° 和 40°C :

$$E_a = \frac{(2.3)(1.98) \log 1.845(303)(313)^*}{10}$$

$$E_a \approx 11,500 \text{ 卡/摩尔}$$

在 30° 和 40°C 之间的 Q_{10} 是

$$Q_{10} = \frac{15.96}{8.65} = 1.85$$

稍有不同的 Q_{10} 值可从每 10° 的温度差中获得。

H. 酶的测定方法

初速度是 $[E]_t$ 的函数

通常在体外实验条件下,酶是以限定的或“催化的”数量出现的,大约为 10^{-12} 到 $10^{-7}M$, 而 $[S]$ 一般为 10^{-6} 到 $10^{-2}M$. 在任一底物浓度下,初速度可以表示为

$$v = \frac{[S]V_{\text{最大}}}{K_m + [S]} = \frac{[S]k_p[E]_t}{K_m + [S]} = \frac{k_p}{\left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right)} [E]_t$$

因此, v 总是与 $[E]_t$ 成正比,而这一事实可用于定量存在的酶。应当强调的是只有当测定的是真正的初速度时, v 和 $[E]_t$ 之间才是线性关系。因为 v 随着 $[S]$ 而变化,所以试验时间必须短到足以保证仅是一小部分底物被利用(5% 或更少些)。图 4-40(a) 表示在不同浓度的酶和固定的 $[S]$ 时,产物生成的情况。产物形成的速率, $d[P]/dt$, 对 $[E]_{t1}$ 到 $[E]_{t4}$ 来说直到时间 t_1 时为止,是一个常数[图 4-40(b)]. 如果选用一个较长的试验时间(例如 t_2),在整个 $[E]_t$ 的范围内,反应曲线将不是线性的。同样,如果使用的酶浓度大于 $[E]_{t4}$,则在试验时间 t_1 内反应曲线也不是线性的。因此,在任何一种试验或动力学的研究中,首先应当确定线性范围,即在 $[P]$ 对时间和 v 对 $[E]_t$ 的反应曲线成为非线性之前,要确定能够积累的产物的最大浓度。

* 原文数字为(293)(303),可能有误。应为 $T_1(30^\circ\text{C}) = (303)$, $T_2(40^\circ\text{C}) = (313)$ ——译者注。

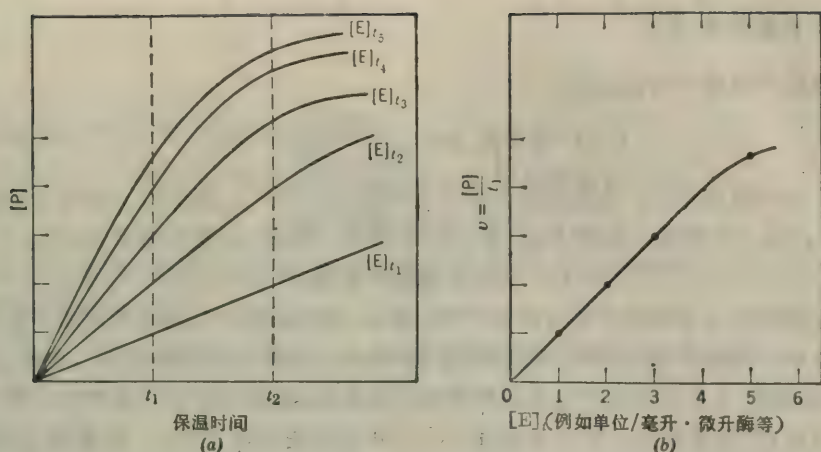


图 4-40 酶的试验。(a) 在酶的不同浓度下, 产物随时间形成的情况。(b) 初速度(用 $[P]/t_1$) 为酶浓度的函数。

酶单位和比活力——定量 $[E]$:

在大多数制剂中酶的实际摩尔浓度是未知数。因此, 酶的存在量只能用其活力表示。为了统一酶活力的报道, 国际生物化学协会酶学委员会规定了一个标准单位:

酶的一个国际单位(IU)是在规定条件下, 每分钟催化形成 1 微摩尔产物的酶量。

在不纯的制剂中, 酶的浓度以酶单位数/毫升表示。有人报道制剂的比活力为酶单位数/毫克蛋白质。当酶被提纯时, 比活力将增加到一个极限值(纯酶的值)。因为 v 随着 $[S]$ 、pH、离子强度、温度等变化而变化, 一个给定的酶制剂能有无限个比活力。因此, 通常所报道的比活力是指在固定的温度下(一般是 25°C、30°C 或 37°C)最适的试验条件, 用的所有底物均为饱和浓度。

酶活力的新单位(katal)已经提出来了。1 个 katal 是每秒钟催化转换一摩尔底物的酶量。于是, 一国际单位 = $1/60$ 微 katal = 16.67 纤 katal。1 katal = 6×10^7 国际单位。比活力也可以用 katal 数/公斤蛋白质或微 katal 数/毫克蛋白质来表示。酶的摩尔活力是以 秒^{-1} 为单位的 katal 数/摩尔蛋白质。

转换数

术语转换数有两种用法, 重新规定为“分子活力”或“克分子活力”, 即在最适条件下每摩尔酶每分钟转化底物的摩尔数(每微摩尔酶的酶单位数)。由于许多酶是含有 n 个亚基的低聚物, 转换数的另一种可能用法是每分钟每摩尔活性亚基或催化中心转化底物的摩尔数(在最适条件下)。催化能力的这后一种定义称之为“催化中心活力”。有时所给的这两个值仅是以 分^{-1} 为单位的数。

$$k_p = \frac{V_{\text{最大}}}{[E]_t} = \frac{(S \rightarrow P) \text{ 的微摩尔} \times \text{分}^{-1} \times \text{毫升}^{-1}}{[E] \text{ 的微摩尔数} \times \text{毫升}^{-1}} = \text{分}^{-1}$$

k_p 的范围从大约 50 到 10^5 分^{-1} 。碳酸酐酶具有已知最高转换数中之一 ($36 \times 10^6 \text{ 分}^{-1}$)。 k_p 的倒数是单一催化周期所需的时间。因此, 对碳酸酐酶来说, $1/k_p = 1/(36 \times 10^6) = 0.028 \times 10^{-6} \text{ 分} = 1.7 \text{ 微秒}$ 。

用积分速度方程定量 $[E]_t$

积分速度方程的一种形式是

$$V_{\text{最大}} t = 2.3 K_m \log \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]} + [P] \quad (50)$$

于是, 对于任一固定 $[S]_0$, 为形成给定的 $[P]$ 所需时间与 $V_{\text{最大}}$ 成反比, 即对于给定的 $[S]_0$ 和 $[P]$, $V_{\text{最大}} t$ 是一个常数。记住 $V_{\text{最大}}$ 是 $[E]_t$ 的量度。因此, 该规则通常表示为:

$$[E]_t \times \text{时间} = \text{常数} \quad (51)$$

如果 n 单位的酶在5分钟内产生1mM产物, 则 $2n$ 单位的酶在2.5分钟内将产生1mM产物, 而 $0.5n$ 单位的酶产生1mM产物将需要10分钟。这种关系适用于 $[S]_0$ 的所有范围。虽然 $2n$ 单位的酶在2.5分钟内产生1mM产物, 但是 $2n$ 单位的酶在5分钟内产生2mM产物就未必是这样(除非 $[S]_0 \gg K_m$, 以致 $v = V_{\text{最大}}$ 和反应是零级反应)。如果 K_m 为已知, 则 $V_{\text{最大}} t = \text{常数}$ 的关系可用于测定 $V_{\text{最大}}$ 。我们只是从固定的 $[S]_0$ 开始测量, 出现一定的 $[P]$ 时所需的时间。但是这种方法, 只有在产物的出现(或者底物的消失)可被连续监测时(例如, 用分光光度法检测NADH的产生或利用)才是切实可行的。

例题 4-18

某无细胞的粗提取液, 每毫升含20毫克的蛋白质。10微升的这种提取液, 在0.5毫升的标准总反应体积中, 于最适试验条件下(最适pH和离子强度, 全部底物、辅酶、活化剂等都是饱和浓度)一分钟内催化形成30纤摩尔的产物。(a)以纤摩尔/试验, 纤摩尔 \times 毫升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$, 纤摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$, 微摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$, 摩尔 \times 分 $^{-1}$ 为单位表示 v 。(b)如果10微升同样的提取液, 在1.0毫升总反应体积中进行试验, v 是多少? (c)酶浓度在试验混合物和提取液中是多大(用单位/毫升表示)? (d)制剂的比活力是多少?

解:

$$\begin{aligned} (a) \quad v &= 30 \text{ 纤摩尔/试验} = \frac{30 \text{ 纤摩尔/分}}{0.5 \text{ 毫升}} \\ &= 60 \text{ 纤摩尔} \times \text{毫升}^{-1} \times \text{分}^{-1} = 60 \times 10^3 \text{ 纤摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1} \\ &= 60 \text{ 微摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1} = 6 \times 10^{-5} M \times \text{分}^{-1} \end{aligned}$$

(b) 形成产物的总数量应是相等的。以浓度表示, 速度应当减少一半。

$$v = 30 \text{ 纤摩尔} \times \text{毫升}^{-1} \times \text{分}^{-1} = 3 \times 10^{-5} M \times \text{分}^{-1}$$

(c) $60 \text{ 纤摩尔} \times \text{毫升}^{-1} \times \text{分}^{-1} = 0.060 \text{ 微摩尔} \times \text{毫升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$ 。

$$[E]_t = 0.06 \text{ 单位/毫升试验混合物}$$

0.5毫升实际试验体积中含0.03单位。这0.03单位来自10微升=0.01毫升的提取液。

$$\therefore [E]_t = \frac{0.03 \text{ 单位}}{0.01 \text{ 毫升}} = 3 \text{ 单位/毫升提取液}$$

$$(d) \quad \text{S. A.} = \frac{3 \text{ 单位/毫升}}{20 \text{ 毫克蛋白质/毫升}} = 0.15 \text{ 单位/毫克蛋白质}$$

例题 4-19

某酶制剂比活力是42单位/毫克蛋白质, 每毫升含12毫克蛋白质。计算在1毫升标准反应

混合物中反应的初速度, (a) 含 20 微升酶制剂; (b) 含 5 微升酶制剂; (c) 试验前该酶制剂应当稀释吗?

解:

首先以单位/毫升计算该酶制剂中酶的浓度.

$$[\text{酶}] = 42 \text{ 单位/毫克蛋白质} \times 12 \text{ 毫克蛋白质/毫升}$$

$$[\text{酶}] = 504 \text{ 单位/毫升}$$

现在可计算以微摩尔/分表示的速度, 考虑到速度与该反应混合物中酶的浓度成正比.

(a) 20 微升酶制剂包含:

$$504 \text{ 单位/毫升} \times 0.02 \text{ 毫升} = 10.08 \text{ 单位的酶}$$

$$v = 10.08 \text{ 微摩尔} \times \text{分}^{-1} \times \text{毫升}^{-1}$$

(b) 5 微升酶制剂含:

$$504 \text{ 单位/毫升} \times 0.005 \text{ 毫升} = 2.52 \text{ 单位酶}$$

$$v = 2.52 \text{ 微摩尔} \times \text{分}^{-1} \times \text{毫升}^{-1}$$

(c) 酶制剂多半需稀释, 以便在适当的试验期间底物不致耗尽. 例如, 在 10 分钟内, 5 微升酶制剂在 1 毫升试验体积中将用尽.

$$(2.52 \times 10^{-6} \text{ 摩尔} \times \text{分}^{-1} \times \text{毫升}^{-1})(10 \text{ 分钟}) = 2.52 \times 10^{-5} \text{ 摩尔/毫升}$$

$$= 2.52 \times 10^{-2} \text{ 摩尔/升} = 2.52 \times 10^{-2} M$$

为了保持所用的底物部分低于 5%, $[S]$ 必须大于 $0.5M$.

例题 4-20

某酶制剂 15 微升, 在标准的最适试验条件下, 1 分钟内催化产生 0.52 微摩尔的产物. (a) 用 150 微升该酶制剂, 在同样的反应条件下, 1 分钟内生成多少产物? (b) 在同样的试验条件下, 用 150 微升该酶制剂产生 0.52 微摩尔的产物应该用多长时间?

解:

(a) 反应的初速度为 0.52 微摩尔/分. 我们的第一个倾向是说 10 倍同样多的酶, 在相同的时间内应产生 10 倍同样多的产物. 然而这种说法只有在整个一分钟内速度保持恒定时才是正确的, 即反应在 1 分钟的间隔范围内保持为零级的. 但是在许多情况下, 因底物浓度的减少会引起反应速度下降到零级范围以外. 用 150 微升酶在 1 分钟内形成的产物数量将是 $10 \times 0.52 = 5.2$ 微摩尔时, 只有假设底物的浓度在 1 分钟末仍然至少是 $100 K_m$, 而且反应产物不是酶的抑制剂.

(b) 如果酶的浓度增加 10 倍, 则产生给定的产物仅需要原来时间的十分之一. 因此, 用 150 微升酶制剂产生 0.52 微摩尔的产物, 相当于用 15 微升酶制剂所需要的时间的十分之一.

$$\therefore t = 0.1 \text{ 分} = 6 \text{ 秒} \quad \text{或} \quad [E]_t \times \text{时间} = k$$

$$(15 \text{ 微升} \times 1 \text{ 分}) = k \quad k = 15 \text{ 微升-分}$$

于是, $(150 \text{ 微升})(t) = 15 \text{ 微升-分}$

$$t = \frac{15 \text{ 微升-分}}{150 \text{ 微升}} = 0.1 \text{ 分} = 6 \text{ 秒}$$

例题 4-21

在最适条件下, 1 微克的纯酶(分子量=92,000)以 0.50 微摩尔/分的速度催化-反应. 计算 (a) 酶的比活力以单位/毫克蛋白质和单位/摩尔为单位, 和 (b) 转换数. (c) 一个催化周期是多长?

解:

$$(a) \quad S. A. = \frac{V_{\text{最大}}}{\text{毫克}} = \frac{0.5 \text{ 微摩尔/分}}{10^{-3} \text{ 毫克}} = 500 \text{ 单位/毫克蛋白质}$$

$$S. A. = (5 \times 10^5 \text{ 单位/克蛋白质}) (9.2 \times 10^4 \text{ 克/摩尔}) \\ = 4.6 \times 10^{10} \text{ 单位/摩尔酶}$$

$$(b) \quad \text{转换数} = (4.6 \times 10^{10} \text{ 微摩尔} \times \text{分}^{-1} \times \text{摩尔酶}^{-1}) \times (10^{-6} \text{ 微摩尔} \times \text{摩尔}^{-1}) \\ \text{转换数} = 4.6 \times 10^4 \text{ 分}^{-1}$$

$$\text{或} \quad 1 \text{ 微克} = \frac{10^{-6} \text{ 克}}{9.2 \times 10^4 \text{ 摩尔/克}} = 1.09 \times 10^{-11} \text{ 摩尔酶}$$

$$\text{转换数} = k_p = \frac{V_{\text{最大}}}{[E]_t} = \frac{0.5 \times 10^{-6} \text{ 摩尔 } S \rightarrow P / \text{分}}{1.09 \times 10^{-11} \text{ 摩尔酶}} = 4.6 \times 10^4 \text{ 分}^{-1}$$

(c) 一个催化周期所需的时间是转换数的倒数. 所以, 一个酶分子把一个 S 分子转化为 P 的时间为

$$\text{时间} = \frac{1}{4.6 \times 10^4 \text{ 分}^{-1}} = 2.17 \times 10^{-5} \text{ 分}$$

例题 4-22

1 克鲜重的肌肉含有 40 单位的某种酶, 其转换数为 $6 \times 10^4 \text{ 分}^{-1}$. 估算酶在细胞内的浓度?

解:

设 1 克鲜重的肌肉大约含有 0.80 毫升的胞内水.

$$\frac{40 \text{ 单位}}{0.80 \text{ 毫升}} = 50 \text{ 单位/毫升} = 50 \times 10^3 \text{ 单位/升} = 50 \times 10^{-3} \text{ 摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$$

$$V_{\text{最大}} = k_p [E]_t \quad \text{或} \quad [E]_t = \frac{V_{\text{最大}}}{k_p}$$

$$\frac{50 \times 10^{-3} \text{ 摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}}{6 \times 10^4 \text{ 摩尔} \times \text{摩尔}^{-1} \times \text{分}^{-1}} = 8.33 \times 10^{-7} M$$

或, 如果我们知道该纯酶的比活力是 500 单位/毫克蛋白质, 和其分子量为 12,000, 我们可以进行如下计算:

$$\frac{50 \times 10^3 \text{ 单位/升}}{(5.0 \times 10^5 \text{ 单位/克酶}) (1.2 \times 10^5 \text{ 克酶/摩尔})} = 8.33 \times 10^{-7} \text{ 摩尔}$$

酶的提纯

使用连续的化学或物理的分级方法可把酶提纯. 每一步的目的是尽可能多地保留酶而尽可能多地除去其他蛋白质、核酸等. 每一步提纯的效率用“产率”或“回收率”(保留下来的原有总酶活力的百分数)和“纯化”或“纯化系数”(用制剂比活力增加的系数)来表示. 提纯的目的在于使这两个因素达到最佳值. 有时为了一个极好的提纯步骤而牺牲了高的产率; 有时不能使用一个好的提纯步骤, 因产率太低. 如果粗的无细胞提取液含有抑制剂, 就会

在提纯的早期阶段观察到产率大于100%。表4-3中列出了一个设想的提纯方案。粗的无细胞提取液,可以用若干方法制备,取决于所用组织或细胞的性质以及制剂的规模。一些普通的细胞破壁方法包括了自溶、融冻、声波振荡、机械研磨(用或不用触磨剂)、冲击匀浆或在任何一种压裂池中(X-挤压机, French 挤压机)进行破碎。这样得到的匀浆通常用离心方法除去未破裂的细胞和大的碎片。关于提纯的步骤是没有一般规律可循,虽然热处理(在有可能时)和硫酸铵沉淀(附录 II 和 III)通常是在提纯顺序初进行。凝胶过滤法可放在硫酸铵沉淀的后面,从而既能起到除去制剂中盐份的作用,又能根据蛋白质分子大小进行分级。如果离子交换层析用于硫酸铵沉淀之后,那么制品先经透析也是一个好主意。或者使制品通过一个快速凝胶过滤柱(例如,葡聚糖凝胶 G-25)。清除硫酸铵会促进蛋白质结合到离子交换柱上。提纯表格中没有列入的其他步骤,可能对于一定的酶有高效率,这些步骤包括差示离心分离(适用于粒线体、叶绿体、核、微粒体、核糖体)、pH 沉淀、有机溶剂沉淀(例如乙醇、丙酮)、硫酸精蛋白或硫酸链霉素沉淀(以沉淀核酸和酸性蛋白质)、亲和层析和制备性的凝胶电泳。在断定制剂是均一的之前,应当用几种方法检测最终制剂的纯度。适用的方法有各种 pH 值和凝胶浓度下进行的圆盘凝胶电泳分析法和超速离心法。均一性的酶制剂在从离子交换柱或凝胶过滤柱上洗脱下来时,必须是单一对称的活力而且具有始终恒定比活力的蛋白质峰。均一性的酶制剂决不需要动力学分析,但是酶越纯来自可耗尽底物或产物的竞争性反应的复杂性就减少。

表 4-3 设想的提纯方案

步 骤	提取液 部分 (毫升)	蛋 白 质		酶				
		浓 度 (毫克/毫升)	总 量 (毫克)	浓 度 (单位/毫升)	比 活 力 (单位/毫克蛋白)	总 量 (单位)	产 率	纯 化 系 数
粗的无细胞提取液	1000	12	12000	5	0.416	5000	"100"	"1.00"
加热: 50°C 加热 5 分钟, 然后除去变性的蛋白质	1000	8	8000	4.8	0.60	4800	96	1.41
硫酸铵沉淀: 饱和度为 30—50% 的区分	250	3	750	11.0	3.67	2730	55	8.83
离子交换层析: DEAE-葡聚糖凝胶, 经 pH 梯度洗脱, 区分 50—60, 每个区分 5 毫升, 合并, 透析并浓缩	25	9	225	88	9.8	2200	44	23.6
离子交换层析: DEAE-葡聚糖凝胶, 经 KCl 梯度洗脱, 区分 21—31, 每个区分 2 毫升, 合并并浓缩	5	7	35	364	52	1820	36.4	125
凝胶过滤: 生物凝胶 P-100, 区分 30—40, 每个区分 1 毫升, 合并	10	0.92	9.2	170	185	1700	34	444
羧基磷石灰层析: 经磷酸缓冲液梯度洗脱, 区分 15—18, 每个区分 1 毫升, 合并	4	0.75	3	375	500	1500	30	1200

例题 4-23

某骨骼肌的无细胞粗提取液, 每毫升含蛋白质 32 毫克。10 微升该提取液在标准最适试验条件下, 以每分钟 0.14 微摩尔的速度催化一个反应。用硫酸铵沉淀法分级分离 50 毫升上

述提取液，将其在饱和度 20—40% 之间沉淀的部分重新溶解于 10 毫升中，得到的这种溶液每毫升含蛋白质 50 毫克，10 微升这种纯化的部分，以每分钟 0.65 微摩尔的速度催化上述反应，计算(a)纯化的部分中该酶回收的百分率，(b)用分级分离法得到的提纯程度(提纯系数)。

解：

该粗的无细胞提取液含

$$\frac{0.14 \text{ 微摩尔/分}}{0.01 \text{ 毫升}} = 14 \text{ 微摩尔} \times \text{毫升}^{-1} \times \text{分}^{-1} = \mathbf{14 \text{ 单位/毫升}}$$

$$14 \text{ 单位/毫升} \times 50 \text{ 毫升总体积} = \mathbf{700 \text{ 总单位}}$$

而 $32 \text{ 毫克蛋白质/毫升} \times 50 \text{ 毫升总体积} = \mathbf{1600 \text{ 毫克总蛋白质}}$
粗的无细胞提取液的比活力是

$$\frac{14 \text{ 单位/毫升}}{32 \text{ 毫克蛋白质/毫升}} = \mathbf{0.4375 \text{ 单位/毫克蛋白质}}$$

纯化的部分包含

$$\frac{0.65 \text{ 微摩尔/分}}{0.01 \text{ 毫升}} = 65 \text{ 微摩尔} \times \text{毫升}^{-1} \times \text{分}^{-1} = \mathbf{65 \text{ 单位/毫升}}$$

$$65 \text{ 单位/毫升} \times 10 \text{ 毫升} = \mathbf{650 \text{ 总单位}}$$

和 $50 \text{ 毫克蛋白质/毫升} \times 10 \text{ 毫升} = \mathbf{500 \text{ 毫克总蛋白质}}$
纯化的部分比活力是

$$\frac{65 \text{ 单位/毫升}}{50 \text{ 毫克蛋白质/毫升}} = \mathbf{1.30 \text{ 单位/毫克蛋白质}}$$

$$(a) \quad \text{回收率} = \frac{\text{纯化的部分中总单位数}}{\text{粗提取液中总单位数}} \times 100\%$$

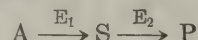
$$\text{回收率} = \frac{650}{700} \times 100\% = \mathbf{93.8\%}$$

$$(b) \quad \text{提纯} = \frac{\text{纯化的部分中的比活力}}{\text{粗提取液的比活力}}$$

$$\text{提纯} = \frac{1.30}{0.4375} \quad \text{提纯} = \mathbf{2.97 \text{ 倍}}$$

有辅助酶的试验

反应产物不能直接检测和定量是常有的事，但可加入一种辅助酶使该产物定量地转化为可测量的另一种物质。总反应顺序是



式中 E_1 是被试验的酶， E_2 是辅助酶， P 通常是一种可用分光光度法观测的化合物(例如 NADH)， E_2 转化 S 为 P 的条件与 E_1 转化 A 为 S 的条件可能不一致(E_2 反应的辅被作用物中的一种可能是 E_1 的抑制剂， E_2 反应的最适 pH 可能完全不同于 E_1 ，等等)。在这种情况下，试验分二个阶段进行。首先将 A 与 E_1 共同保温(加各种辅被作用物)一段时间，使 S 积累到可检测的浓度。然后终止反应(例如用煮沸或改变 pH 值)，随后加入 E_2 和所有必需的辅被作用物，并让反应进行直到第一阶段中所积累的全部 S 都转化为 P ，然后测量 P 。问题是，第二阶段的保温时间应多么长以便使固定量的 E_2 和 E_2 的饱和辅被作用物把 S 最高

水平转化成 P ? 关于任一水平 S 的保温时间可从积分速度方程计算:

$$t = \frac{2.3K_{ms}}{V_{\text{最大}}}\log \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]} + \frac{[P]}{V_{\text{最大}}} \quad (52)$$

因为部分的反应将是一级的, S100% 转化为 P 将用无限长的时间. 我们可满足于 98% 的转化, 以其不致引入任何显著的误差.

如果辅助酶很贵，那么我们会希望用解出 $V_{\text{最大E}}$ 值的方法计算出在适当时间内反应完成所需的最低酶量。

如果 K_{ms} 比允许积累的 S 最大浓度大 100 倍或更大时, 那么 S 转换为 P 的反应对 S 来说总是一级反应, 在这种情况下, S 的浓度可用测量第二阶段反应初速度的方法来测定:

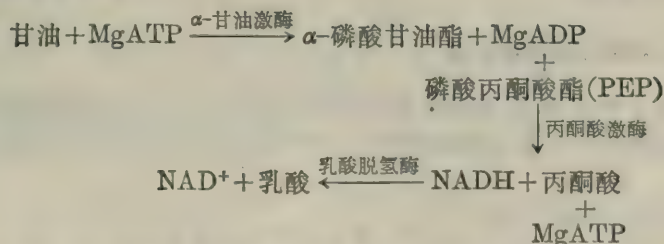
$$v = k[S] = \frac{V_{\text{最大E}_2}}{K_{mS}} [S] \quad \therefore [S] = \frac{v K_{mS}}{V_{\text{最大E}_2}} \quad (53)$$

偶联试验

如果反应 $S \xrightarrow{E_2} P$ 所需条件中没有一个条件是不利于反应 $A \xrightarrow{E_1} S$ 的(而且反之亦然), 那么该试验的两个阶段可同时进行。 E_1 的存在量可用测量 P 形成的速度来测定。以下条件对有效的偶联试验是必需的: (a) 在试验时间内, 对 $[A]$ 来说, 第一步反应必须是零级反应, 而且是不可逆的; (b) 对 S 来说, 第二阶段的反应必须是一级反应而且是不可逆的。条件 (a) 是容易满足的, 如果实验期间仅是用去一小部分 $[A]_0$ 或者对于 E_1 来说, 如果 $[A]_0 \gg K_{m1}$ 而且所有辅被作用物都是饱和的。由于 S 在第二阶段反应中被移去, 故假定它是不可逆的。条件 (b) 是可以满足的, 如果对于 E_2 来说, S 的稳态浓度 $[S]_{ss}$ 是 $\ll K_{m2}$ 。通过使用充分过量的 E_2 , $[S]_{ss}$ 可维持在 $\ll K_{m2}$ 。反应的不可逆性是可以设想的, 如果 E_2 反应的平衡远远趋向右边, 或者如果该反应的副产物之一不断地消除, 或者该反应仅进行到很小的程度。在这些条件下, 经过短时间的延迟后, A 将产生一定量的 $[S]_{ss}$, 此后 P 形成的速度会是恒定的而且与酶 $[E_2]$ 成比例。如果将 $[E_2]$ 加倍, $[S]_{ss}$ 也会加倍, 而且 P 形成的速度也会加倍。加倍了 $[E_2]$, $[S]_{ss}$ 就减半, 然而由于 $S \rightarrow P$ 的反应速度是由 $v_2 = k_2[S]_{ss}[E_2]$ 给定的, 所以 v_2 是不变的。因此一旦有充分过量的 E_2 存在, P 形成的速度将与 E_2 无关。

例题 4-24

某心脏学家在研究在鼠心脏中乙醇对甘油三酯积累的影响。甘油三酯皂化后释放出的甘油用偶联酶系统测定表示如下：



甘油的浓度可自 NADH 浓度中的减少量来计算(NADH 可用分光光度法测定,如第五章所述)。α-甘油激酶是相当贵的。在 1.0 毫升的反应混合物中需要多少这种酶的最低量(单位)以便在 15 分钟内“完成”反应,如果可能存在的甘油最大浓度是 0.3 微摩尔/毫升,全部

的其他酶和底物都是过量的, α -甘油激酶对甘油的 K_m 是 $1.5 \times 10^{-4} M$ 。

解:

积分速度方程可重新整理为

$$V_{\text{最大}} = \frac{2.3K_m}{t} \log \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]} + \frac{[P]}{t}$$

如果我们假定这个反应完成在 $[S]_0$ (甘油) 的 98% 已经转化为 P (α -磷酸甘油) 时, 那么, $[S]_0 = 3 \times 10^{-4} M$, $[P] = 2.94 \times 10^{-4} M$, $[S]_0 - [P] = 6 \times 10^{-6} M$ 。

$$\begin{aligned} V_{\text{最大}} &= \frac{(2.3)(1.5 \times 10^{-4}) M}{15 \text{ 分钟}} \log \frac{(3 \times 10^{-4}) M}{(6 \times 10^{-6}) M} + \frac{2.9 \times 10^{-4} M}{15 \text{ 分钟}} \\ &= (2.3 \times 10^{-5})(1.7) + 1.96 \times 10^{-5} = 5.87 \times 10^{-5} M/\text{分} \\ &= 0.0587 \text{ 毫 } M/\text{分} = 0.0587 \text{ 微摩尔} \times \text{毫升}^{-1} \times \text{分}^{-1} \end{aligned}$$

或者

0.0587 单位/毫升

因为 $[E]_t \times t = \text{常数}$, 这位心脏学家可用一半的酶量并在 30 分钟后读 NADH 的减少量。

我们不会得到精确的答案, 如果反应仅仅是一级动力学的或仅仅是零级动力学的, 因为 $[S]$ 开始于大于 K_m 处, 而又远远低于 $100 K_m$ 。

I. 多底物酶及其动力学机制

大多数的酶催化两个或多个底物间的反应, 得出两个或多个产物。大多数的普通生物化学教科书只限于讨论单个反应物系统。因此, 人们总不理解某个特殊底物的 K_m , 在一组固定的辅被作用物浓度下, 可能不是“真实”的 K_m , 而是, 随着辅被作用物浓度变化而变化的表观值。同样, 某制剂在一个底物的饱和浓度下所观测的 $V_{\text{最大}}$, 可能不同于另一个底物也饱和时所观测的“ $V_{\text{最大}}$ ”值。特殊底物的真正的 K_m 是在所有其他底物都饱和时观测到的。真正的 $V_{\text{最大}}$ 是在全部存在的底物都以饱和浓度时观测到的。抑制常数也受固定的底物浓度的影响。因此, 观测到的“ K_i ”可能并不代表真正的抑制剂解离常数。

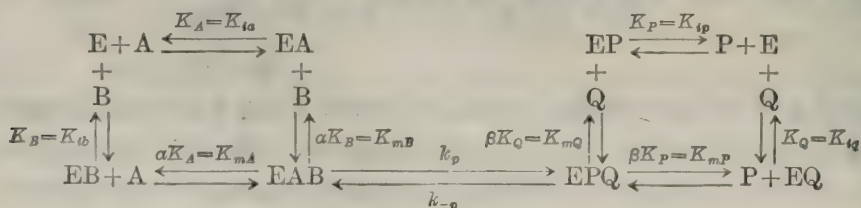
在这第一节中, 将通过考查某些常见的双反应物系统介绍多反应物酶的课题。我们用 A 和 B 表示配体, 其中 B 是底物而 A 可能是辅被作用物或辅酶或必需的活化剂。

设由己糖激酶催化的反应是:

葡萄糖 + MgATP \rightleftharpoons 葡萄糖-6-磷酸 + MgADP 理论上该反应能以多种动力学机制进行。这些要在下面叙述。

快速平衡随机双双(BiBi)的作用机制

这两个底物(用 A 和 B 表示)能随机地加到酶中(图 4-41), 正象在经典的非竞争性抑制或混合类型的抑制系统中, S 和 I 所做的那样, 该产物(用 P 和 Q 表示)也可以随机的脱离。



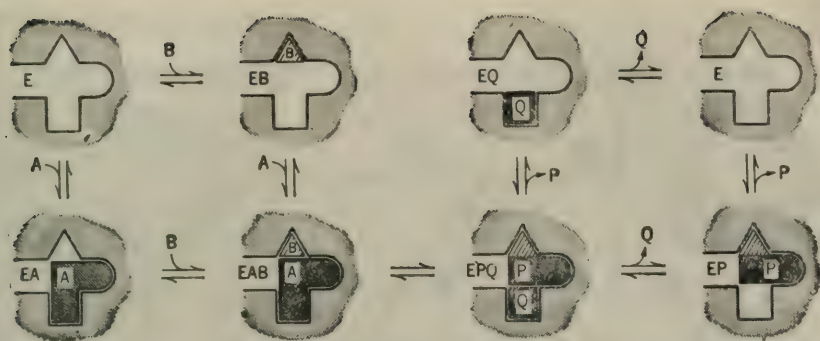


图 4-41 基团转移反应随机动力学机制的示意图, 在游离酶上的结合部位对两个底物都是适用的。

A 与游离酶结合解离常数为 K_A (在 Cleland 命名法中也称之为 K_{ia}), B 与游离酶结合解离常数为 K_B (或 K_{ib})。一个底物与酶的结合可改变酶对其他底物结合的亲和力。于是, A 与 EB 结合解离常数为 αK_A , 因为在 EAB 和 E 间的总平衡常数不管采取什么途径必须是相同的, 所以 B 与 EA 结合解离常数也应是 αK_B , αK_A 与 K_{mA} 是相同的 (在 [B] 饱和时 A 的 K_m)。 αK_B 与 K_{mB} 是相同的 (在 [A] 饱和时 B 的 K_m)。如果速度限制步骤是 EAB 到 EPQ 的缓慢转化, 我们能在 P 和 Q 不存在的情况下, 用一般方法导出正向反应的速度方程。事实上, 快速平衡随机的双反应物系统和非竞争性抑制或线性混合型抑制之间的唯一区别是现在三元复合物 (EAB) 是有催化活性的, 而 ESI 没有。

$$v = k_p [\text{EAB}] \quad \text{和} \quad \frac{v}{[\text{E}]_t} = \frac{k_p [\text{EAB}]}{[\text{E}] + [\text{EA}] + [\text{EB}] + [\text{EAB}]}$$

将每一种形式酶的浓度用游离酶来表示, 我们得到

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{\frac{[\text{A}][\text{B}]}{\alpha K_A K_B}}{1 + \frac{[\text{A}]}{K_A} + \frac{[\text{B}]}{K_B} + \frac{[\text{A}][\text{B}]}{\alpha K_A K_B}} \quad (54)$$

$$\text{或} \quad \frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[\text{A}][\text{B}]}{\alpha K_A K_B + \alpha K_B [\text{A}] + \alpha K_A [\text{B}] + [\text{A}][\text{B}]} \quad (55)$$

式中, $V_{\text{最大}} = k_p [\text{E}]_t$ 。

在其他底物为固定水平时, 该方程可重新整理以显示随便 A 或 B 为变化的底物。例如当 [A] 改变时:

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[\text{A}]}{\alpha K_A \left(1 + \frac{K_B}{[\text{B}]}\right) + [\text{A}] \left(1 + \frac{\alpha K_B}{[\text{B}]}\right)} \quad (56)$$

在 [B] 固定时, 该速度方程可以写成

$$\frac{v}{V_{\text{最大表}}} = \frac{[\text{A}]}{K_{mA\text{表}} + [\text{A}]} \quad (57)$$

式中, $V_{\text{最大表}}$ 和 $K_{mA\text{表}}$ 为 [B] 固定时的表观常数。我们从方程 (56) 中看到当 [B] 饱和时, 常数是 αK_A (即 K_{mA}) 和真正的 $V_{\text{最大}}$ 。 (当 $[\text{B}] = \infty$ 时, $K_B/[\text{B}]$ 和 $\alpha K_B/[\text{B}]$ 两项趋于零)。在 B 的不同固定浓度下, 对变化的 [A] 所做的倒数图见图 4-42。变化的 [B] 的这种图形则与变化的 [A] 的图形相对称。

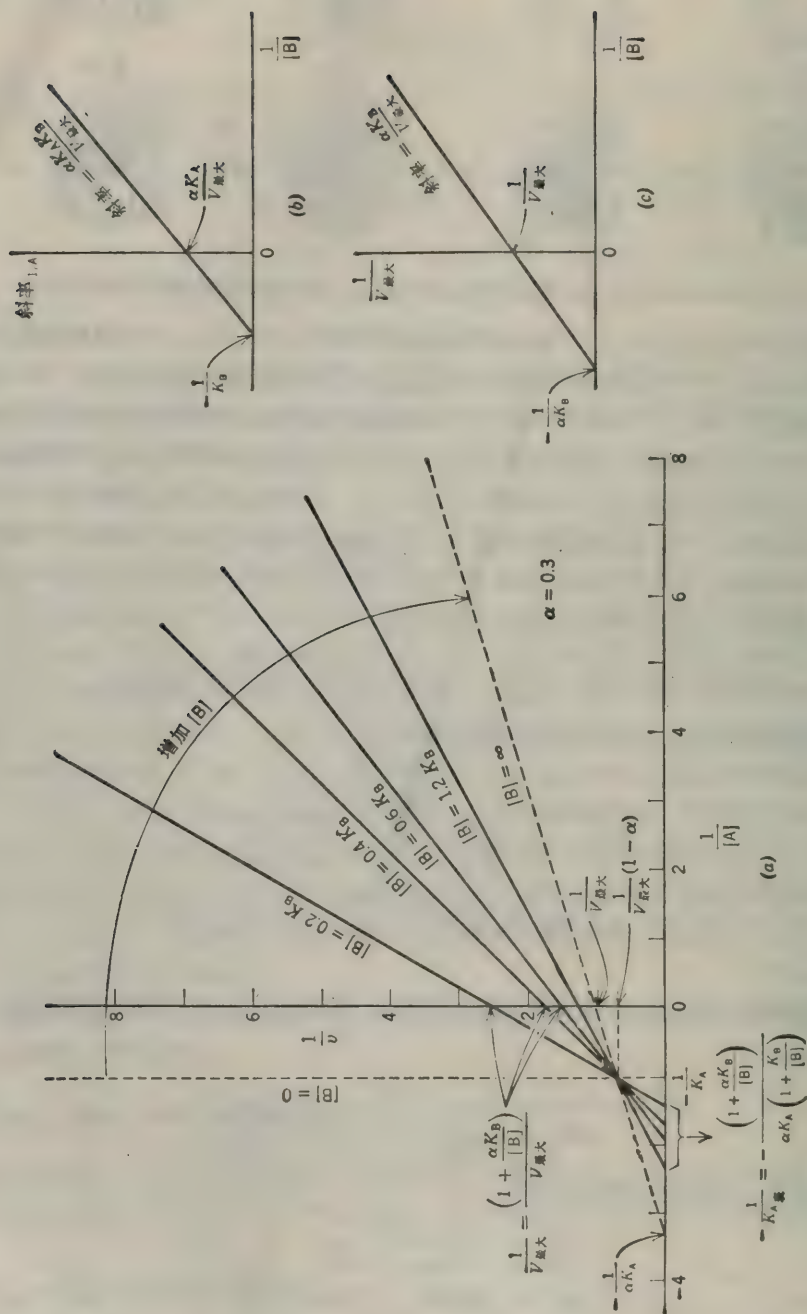


图 4-42 (a) $1/v$ 对 $1/[A]$ 作图, 为快速平衡随机系统, 在 B 的不同固定浓度下, 其中相互作用系数 α 是 0.3。
(b) 斜率 $1/v$ 对 $1/[B]$ 的再作图, 以得到 K_B 。(c) $1/v_{max}$ 对 $1/[B]$ 的再作图得到 αK_B 和 V_{max} 。

有序的双双(BiBi)作用机制

A 与酶结合后使酶的构象发生变化, 暴露出与 B 的结合部分使 B 与酶结合(图 4-43)。

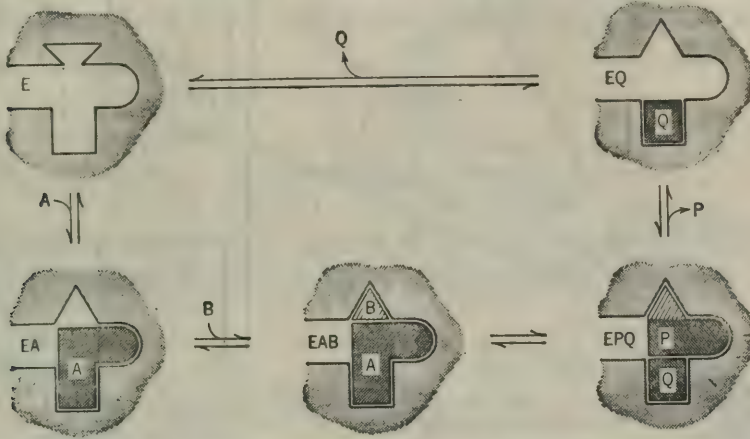
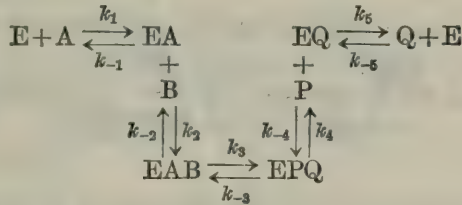
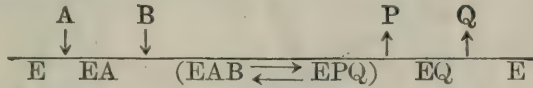


图 4-43 基团转移反应有序动力学机制的示意图。A 与酶结合引起了酶本身发生构象变化, 暴露出来 B 的结合部位。因此, B-P 部位只有在 A-Q 部位占用了时才是可接近的。

该反应顺序是



或者, 在 Cleland 的简略图解中:



如果 EAB 转化为 EPQ 是速度限定步骤, 以便 E、A、EA、B 和 EAB 都处于平衡状态, 该方程是

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{\frac{[A][B]}{K_A K_B}}{1 + \frac{[A]}{K_A} + \frac{[A][B]}{K_A K_B}} \quad (58)$$

或

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[A][B]}{K_A K_B + K_B [A] + [A][B]} \quad (59)$$

如果 EAB 转化为 EPQ 象解离反应那样迅速, 则必须用稳态的假定来推导该速度方程。在多反应物系统中, 快速平衡和稳态处理法并不提供相同的最终方程式。对于有序的双 BiBi 系统用稳态法推导, 得到如下方程:

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[A][B]}{K_{id} K_{mB} + K_{mB} [A] + K_{mA} [B] + [A][B]} \quad (60)$$

式中, K_{id} 是 A 的解离常数, 而 K_{mA} 是在 [B] 饱和时速度为最大速度一半时 A 的浓度。其倒数图见图 4-44 和 4-45。

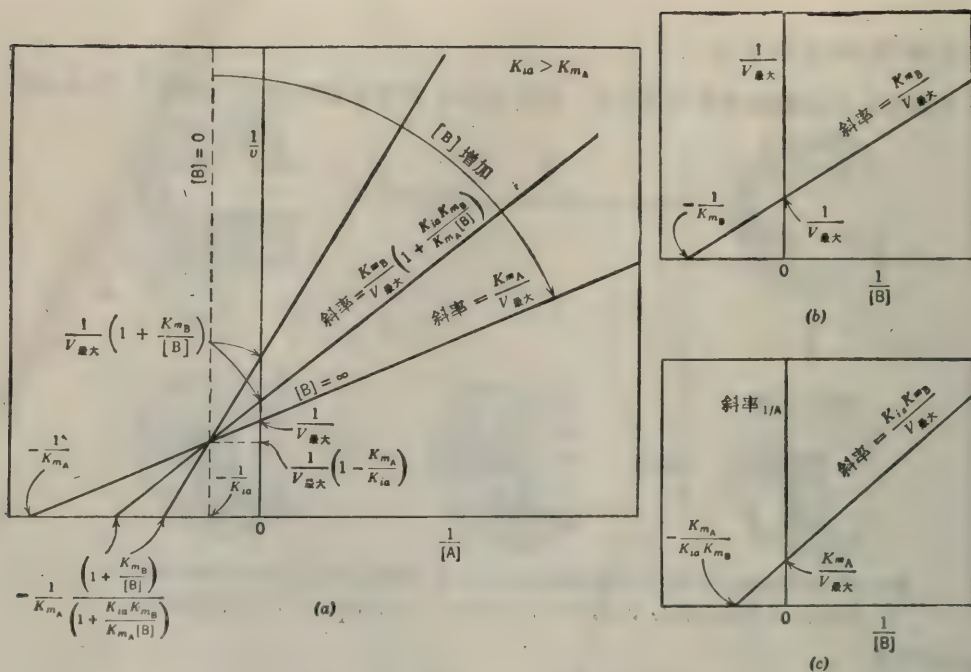


图 4-44 有序的 BiBi 系统。(a) $1/v$ 对 $1/[A]$ 作图, 在 B 的不同固定浓度下; (b) $1/v$ 轴的截距再作图; (c) 斜率 $1/A$ 的再作图。

虽然命名法不同, 图 4-44 与图 4-42 是相等的。于是, 仅是初速度测量并不能区分随机的和有序的二种机制。

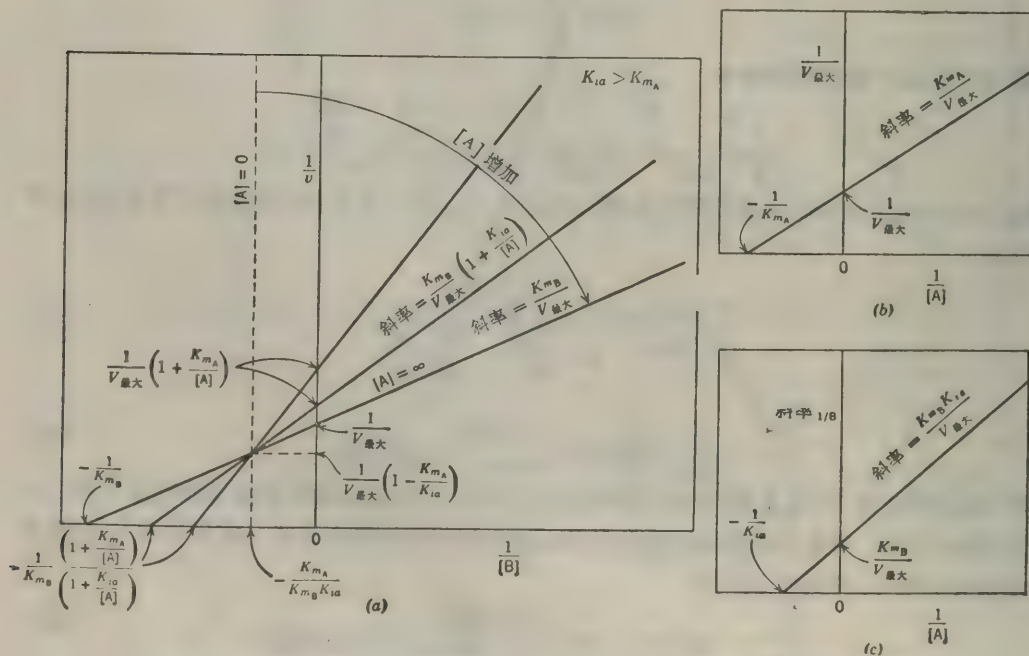
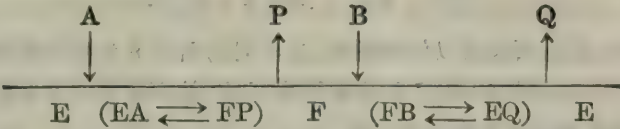


图 4-45 有序的 BiBi 系统。(a) $1/v$ 对 $1/[B]$ 作图, 在 A 不同固定浓度下; (b) $1/v$ 轴截距再作图; (c) 斜率 $1/B$ 再作图。

双双(BiBi)乒乓机制

第三种可能的机制涉及到磷酸从 Mg ATP 转移到酶上, 随后是在葡萄糖结合以及得到磷酸之前释放出 MgADP(图 4-46)。这种机制称之为乒乓机制, 因为酶在 E 和 F 两种稳定形式之间摆动。该反应顺序是:



其中, A=Mg ATP, P=Mg ADP, B=葡萄糖, 而 Q=葡糖-6-磷酸, EA 代表酶-Mg ATP, FP 代表酶-磷酸-Mg ADP, 酶形式 F 代表稳定的(可能是共价结合)酶-磷酸。FB 代表酶-

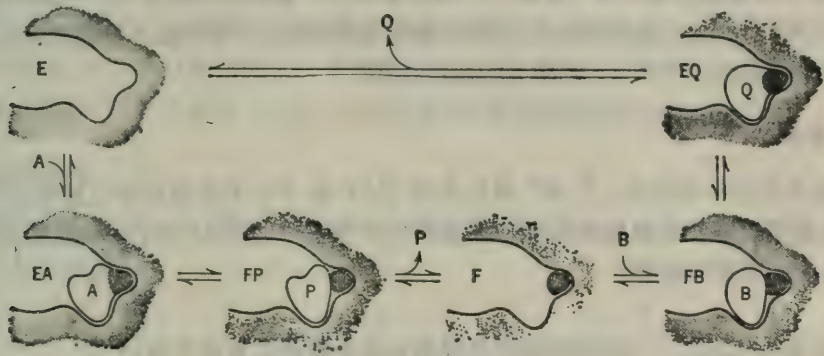


图 4-46 基团转移反应乒乓动力学机制的示意图。供体 A 与 E 反应生成取代酶; P 脱离在受体加入之前。

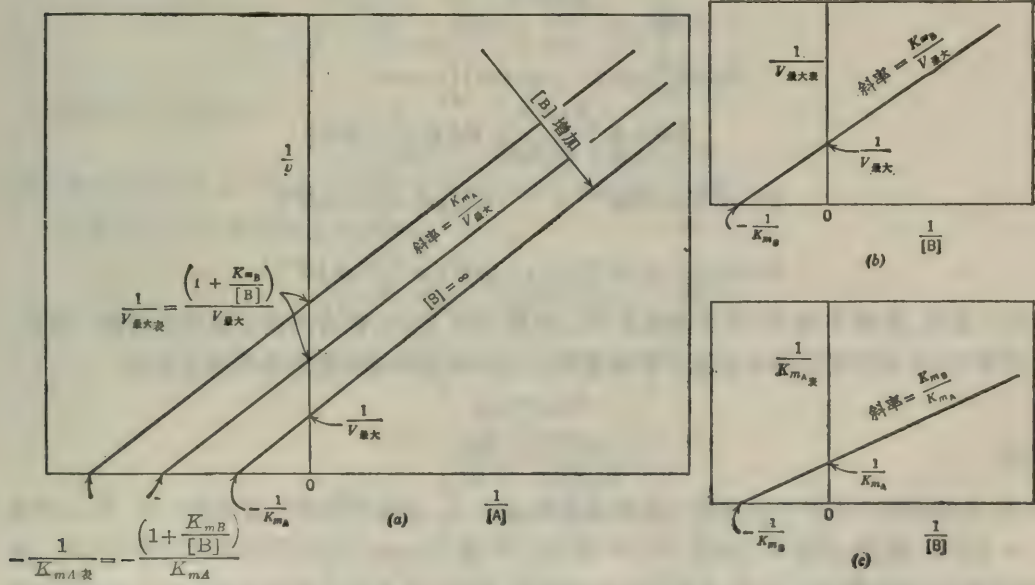


图 4-47 双双乒乓系统。(a) $1/v$ 对 $1/[A]$ 作图, 在不同的固定的 B 浓度下。(b) $1/v$ 轴的截距再作图。(c) $1/K_{mA}$ 再作图, B 作为变化底物的线图和再作图是对称于与表示 A 的那些图。

磷酸-葡萄糖而 EQ 代表酶-葡萄糖-6-磷酸。用稳态法处理得到

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[A][B]}{K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]} \quad (61)$$

当重新整理上式以表示不同的固定 [B] 浓度下 A 作为变化的底物, 该方程成为

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[A]}{K_{mA} + [A] \left(1 + \frac{K_{mB}}{[B]}\right)} \quad (62)$$

由于在分母中的 K_{mA} 项未乘以任何系数, 在不同的固定 B 浓度下所得到的倒数图的族系将是平行的。当 [B] 在不同的固定 A 浓度下改变时, 就产生了一个对称的方程。改变了的 [A] 的倒数图和再作图表示在图 4-47 中。

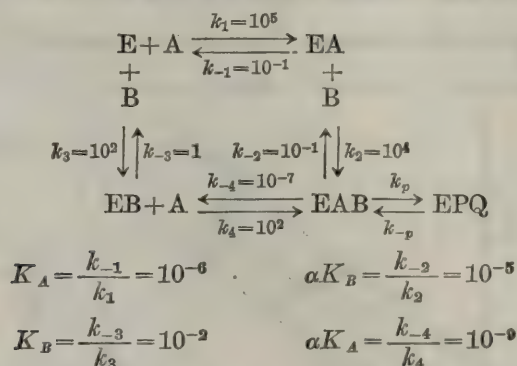
己糖激酶并不产生平行的倒数图, 因此, 可以放弃乒乓机制。但是单靠初速度研究并不能区分随机快速平衡和稳态有序这两种机制。两者都得到相同的速度方程和相交的倒数图系。必须运用其他的判断方法 (例如, 产物抑制作用, 盲端的抑制作用, 平衡底物的结合和同位素交换的研究)。这些方法在作者的《酶动力学: 快速平衡和稳态酶系的行为和分析》[Wiley-Interscience(1975)] 一书中有详细的叙述。

例题 4-25

假如不能违反热力学的定律, 总 $\Delta G'$ 或从 E 到 EAB 的 K'_{E} 不管采取什么途径必须是相同的。说明怎样有可能使有序的双反应物顺序 $E \longrightarrow EA \longrightarrow EAB$ 进行, 即顺序 $E \longrightarrow EB \longrightarrow EAB$ 应否同样可能呢?

解:

以下所示的 E 和 EAB 之间的反应顺序是用某些任意值代入速度常数的。



用任一途径, 游离 E 和 EAB 之间的总 K_{E} 都是 10^{11} 。因此, 没有违背了热力学定律。但是, 一条到 EAB 途径的正向反应速度常数乘积比另一条途径速度常数乘积要大很多。

$$k_1 k_2 \gg k_3 k_4$$

即使

$$\frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}} = \frac{k_3 k_4}{k_{-3} k_{-4}}$$

于是, 总反应顺序有一个动力学上的优选途径, 实际上, 该顺序表现为强制地有序: $E \longrightarrow EA \longrightarrow EAB$ 。此外, 单独以 [A] 在 $10^{-7}M$ 到 $10^{-5}M$ 范围内的结合研究会得到大量的 EA。单独用 [B] 在 $10^{-6}M$ 到 $10^{-4}M$ 范围内结合的研究会产生很少的或察觉不到的 EB。然而, 在 A 存在的情况下, 在这一 [B] 的范围内, v 是 $V_{\text{最大}}$ 的一个较大的部分。

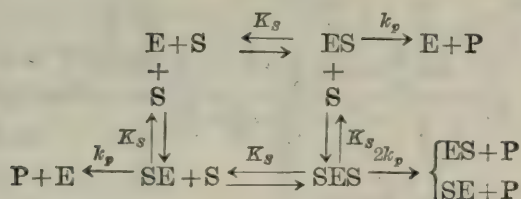
J. 多部位酶和别构酶

许多酶是由各别的亚基或单体组成的低聚物。这些亚基常常是相同的, 每个亚基带有一个催化部位。如果这些部位是相同的而且是彼此完全独立的, 那么, 一个部位上有底物存在, 就不会影响空位的结合特性, 也不会影响其他已占用部位的催化活力。如果该酶是一个四聚体, 那么在底物的任一固定浓度下, $[E]_t$ 将分布到 E 、 ES_1 、 ES_2 、 ES_3 和 ES_4 五种形式中。然而, 正象我们将要看到的, S 结合曲线或速度曲线将是常见的双曲线。换句话说, 一个部位的酶 n 个分子与 n 个部位的酶一个分子的表现是相同的。虽然部位之间没有明显的相互作用, 但是, 隔离的单体常常是完全没有活性的。缔合成四聚体的作用可能引起每个单体的三级结构中发生小的变化, 导致了底物结合部位的形成或者底物结合部位和催化基团的适当并列。寡聚作用也可能促使体内酶的稳定性。

如果在一个部位上底物的存在确实影响了底物与空位的结合或在其他已占用的部位形成产物的速率, 那么我们就遇到了一种情况, 其中底物本身相当于一个调节物或效应物产生了底物活化作用(包括 S 形的 v 对 $[S]$ 的反应曲线)或底物抑制作用。

非协同性的部位

让我们首先探讨一个二聚物(二-部位)模型, 其中两个部位是相同的而且独立的。底物结合顺序如下所示:



速度由下式给出:

$$v = k_p[ES] + k_p[SE] + 2k_p[SES]$$

SES 的活性比 ES 或 SE 的大两倍, 因为两个结合部位都已填满。!

用普通的方法得到的速度方程是

$$\begin{aligned}
 \frac{v}{[E]_t} &= \frac{k_p[ES] + k_p[SE] + 2k_p[SES]}{[E] + [ES] + [SE] + [SES]} \\
 [ES] &= \frac{[S]}{K_s} [E] \quad [SE] = \frac{[S]}{K_s} [E] \\
 [SES] &= \frac{[S]}{K_s} [ES] = \frac{[S]^2}{K_s^2} [E] \\
 \therefore \frac{v}{[E]_t} &= \frac{k_p \frac{[S]}{K_s} + k_p \frac{[S]}{K_s} + 2k_p \frac{[S]^2}{K_s^2}}{1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{K_s^2}} = \frac{2k_p \frac{[S]}{K_s} + 2k_p \frac{[S]^2}{K_s^2}}{1 + \frac{2[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{K_s^2}}
 \end{aligned}$$

当两个部位都填满, 就能观察到 $V_{\text{最大}}$ 。因此, 我们可以指定 $2k_p[E]_t$ 为 $V_{\text{最大}}$:

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{\frac{[S]}{K_S} + \frac{[S]^2}{K_S^2}}{1 + \frac{2[S]}{K_S} + \frac{[S]^2}{K_S^2}} \quad (63)$$

分子中含有两项，因为有两种形成产物的复合体。分母反映出有三种酶形式存在（自由酶、单占用酶和双占用的酶）。系数 2 表示实际上有两个单占用形式（底物在一个部位上或底物在另一个部位上）。四聚体的速度方程可用同样方法得到，如表示在图 4-48 中。如果取 $4k_p[E]$ 作为 $V_{\text{最大}}$ ，该方程就成为

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{\frac{[S]}{K_S} + \frac{3[S]^2}{K_S^2} + \frac{3[S]^3}{K_S^3} + \frac{[S]^4}{K_S^4}}{1 + \frac{4[S]}{K_S} + \frac{6[S]^2}{K_S^2} + \frac{4[S]^3}{K_S^3} + \frac{[S]^4}{K_S^4}} \quad (64)$$

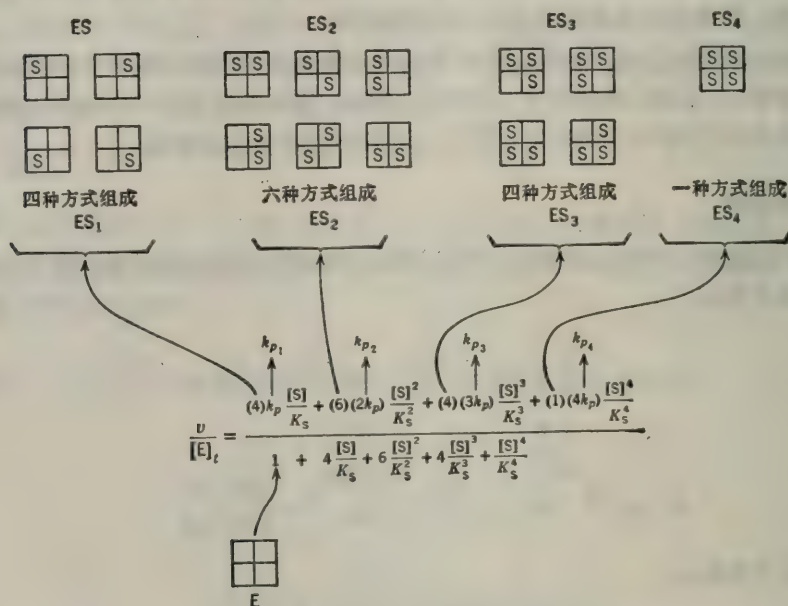


图 4-48 具有四个相同亚基的酶的分配形式。

一般说来，酶具有 n 个相同催化部位的速度方程式是

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{\frac{[S]}{K_S} \left(1 + \frac{[S]}{K_S}\right)^{n-1}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_S}\right)^n} \quad (65)$$

上述方程可简化为

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{\frac{[S]}{K_S}}{1 + \frac{[S]}{K_S}} = \frac{[S]}{K_S + [S]}$$

因此，不考虑 n 值， v 对 $[S]$ 的图型是双曲线的。从反应的动力学中是不可能分辨出我们是在处理 1 微微摩尔的带有 n 个相同部位的酶还是在处理 n 个微微摩尔的只有一个部位的酶。

别构酶——协同结合

至此,我们已经讨论了具有多个而独立的底物结合部位的酶,即一个分子底物的结合不影响其它空位的固有解离常数。上述的酶提供的是正常双曲线形的速度曲线。但是,如果一个底物分子的结合导致了结构的或电子的变化,从而改变了空位的亲和力,则其速度曲线将不再遵循 Henri-Michaelis-Menten 动力学,而这种酶就归类为别构酶。在十之八九的情况下,别构酶的多个底物结合部位存在于不同的蛋白质亚基上。别构酶通常提供的是 S 形的速度曲线。一个底物分子的结合,以增加空位的亲和力而促进了下一个底物分子的结合。这个现象就底物结合情况而言称为“协同结合”或“正协同性”或“正相同变反应”。不同配位体(例如底物和活化剂,底物和抑制剂,抑制和活化剂)间的相互作用称之为“异相反应”可能是正的或负的。

变化底物 S 形曲线,其潜在优点列于图 4-49 中。为了比较起见,也在图中表示了 $[S]_{0.9}$ 的正常双曲线速度曲线。在 $[S] = 0$ 和 $[S] = 3$ 之间时,双曲线形的反应曲线是减速的,但仍升高到 $0.75V_{\text{最大}}$,而 S 形曲线按指数地加速,但只达到 $0.10V_{\text{最大}}$,介于 $[S]$ 的同样范围内。然而, S 形曲线从 $0.10V_{\text{最大}}$ 增加到 $0.75V_{\text{最大}}$ 只用了 2.3 倍 $[S]$ 的增加量。为涉及同样的比速范围,双曲线需要在 $[S]$ 中增加 27 倍。因此, S 形曲线,在某种意义上表现为一个“开关电钮”。另外,在居中的比速度, S 形反应曲线通过底物浓度的变化对反应速率提供了一个更为灵敏的控制。

术语“别构”最初是由 Monod, Changeux 和 Jacob 应用于那些与底物没有类似结构的配体(效应物或调节物)存在时,呈现出改变了的动力学性质的酶。别构反应用代谢调节和细胞的能量节约(例如,最终产物对序列反应中第一步反应的反馈抑制)的词语来表示一般是很好的理解的。大多数的别构酶显示了配体饱和和 S 形曲线。因此,别构作用已成为 S 形反应曲线的同义词。(但是,不是所有的 S 形的结合曲线或速度曲线都是起因于别构的相互作用。)

关于别构酶已推荐了两个主要的模型:“序列的相互作用”模型和“协调对称”模型。正如名称所启示的,“序列的”模型假定了当结合部位占用时,空位的亲和力是序变的或递增的。“协调对称”模型假定了酶存在为高亲和力的低聚物和低亲和力的低聚物的平衡混合物。配体包括底物在内,其作用是移动平衡便利于一种状态或另一种状态。在转化时,所有亚基的构象同时改变。

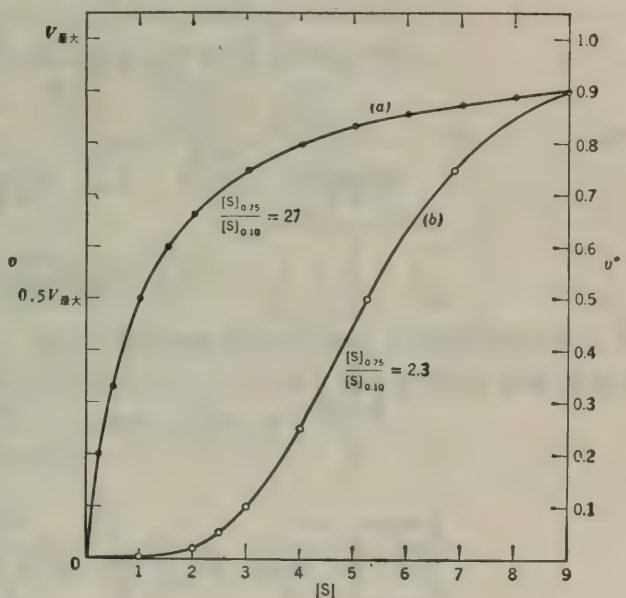
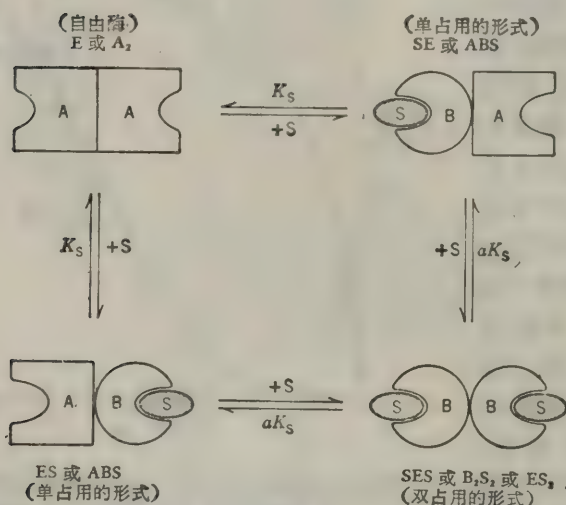
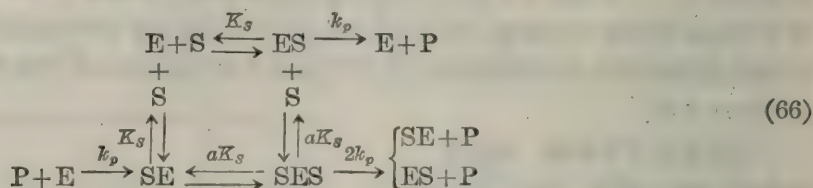


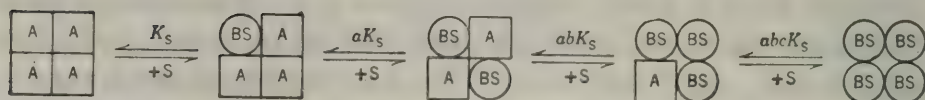
图 4-49 速度曲线的比较: 两个不同的酶在 $[S] = 9$ 时巧合地具有相同速度。(a) 双曲线。(b) S 形曲线。

简单的序列相互作用模型

别构酶的最简单模型是 Koshland 的“适应酶 (flexible enzyme)”或“诱导契合”模型的扩展。这种模型假定了酶在构象上的显著变化会起因于底物或其它配体的结合。这些构象的变化能引起空位亲和力的改变(包括先前隐藏部位的暴露)。事实上, 每个底物分子与酶结合, 使下一个底物分子结合更容易些。由此得出的速度曲线具有一个显著的加速相, 随后当酶接近饱和状态时, 正常的倾斜下来。让我们研究一下具有两个协同部位的别构酶[图 4-50(a)]. 其反应是



(a) 二聚体



(b) 四聚体

图 4-50 别构酶序列相互作用模型。由于每一个部位都已占用, 携带该部位的亚基就要经过一个从构象 A 到构象 B 的变化。因此, 亚基间建立了新的相互作用和空位改变了亲和力, K_S 代表解离常数。于是, 如果空位的亲和力增加了, a 、 b 和 c (相互作用系数) 都 <1 的, 我们就可观察到正协同性 (S 形的速度曲线)。序列相互作用模型也提供了负协同性 (a 、 b 和 $c > 1$)。 (a) 二聚体模型。所示为两种排列 S 以形成单占用形式的方法。 (b) 四聚体模型。为了简便起见, 仅表示了四种占用形式的一种排列方法。

当一个部位已占用时,另一个空位的解离常数变为 aK_s , 而 $a < 1$. 该速度方程是

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{\frac{[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{aK_s^2}}{1 + \frac{2[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{aK_s^2}} \quad (67)$$

这个速度方程未简化成 Henri-Michaelis-Menten 方程.

下一步, 设有一个别构的四聚体[图 4-50(b)]. 底物 S 的第一个分子解离常数 K_s 结合到四个空位中的任一个部位上, 结果所有其他三个空位的解离常数都变为 aK_s . 当结合上 S 的第二个分子时, 剩下的两个部位的解离常数乘以系数 b 变成 abK_s . 当结合上 S 的第三个分子时, 最后一个空位的解离常数乘以系数 c 变成 $abcK_s$. 注意, 效应是递增的和累积的.

给出的速度为

$$v = k_p[ES_1] + 2k_p[ES_2] + 3k_p[ES_3] + 4k_p[ES_4]$$

用 $[E]$; 除方程的两边并引入统计学系数如图 4-48 所示, 我们得到

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{\frac{[S]}{K_s} + \frac{3[S]^2}{aK_s^2} + \frac{3[S]^3}{a^2bK_s^3} + \frac{[S]^4}{a^3b^2cK_s^4}}{1 + \frac{4[S]}{K_s} + \frac{6[S]^2}{aK_s^2} + \frac{4[S]^3}{a^2bK_s^3} + \frac{[S]^4}{a^3b^2cK_s^4}} \quad (68)$$

式中, $V_{\text{最大}} = 4k_p[E]_t$.

别构酶的简化速度方程——希尔(Hill)方程

设某酶有 n 个等同的结合部位. 如果在底物结合上的协同性是很显著的(即系数 a 、 b 、 c 等是很小的数), 那么, 在任一比 K_s 大得多的 $[S]$ 下, 少于 n 个分子底物的全部酶-底物复合物浓度则可略去不计. 在这种情况下, 该速度方程将取决于 $[S]^n$ 项.

例如, 四个结合部位酶的方程可简化为

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{\frac{[S]^4}{a^3b^2cK_s^4}}{1 + \frac{[S]^4}{a^3b^2cK_s^4}} = \frac{\frac{[S]^4}{K'}}{1 + \frac{[S]^4}{K'}} \quad \text{或} \quad \frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[S]^4}{K' + [S]^4}$$

式中 $K' = a^3b^2cK_s^4$

通式:

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[S]^n}{K' + [S]^n} \quad (69)$$

上述方程称为希尔方程.

n = 每分子酶底物结合部位的数目,

K' = 常数, 由相互作用系数 a 、 b 、 c 等以及固有解离常数, K_s 组成
 $= K_s^n (a^{n-1}b^{n-2}c^{n-3} \dots z^1)$.

上述方程中的常数 K' , 不再等于给出最大速度一半时的底物浓度(除非当 $n=1$ 时, 当该方程简化为 Henri-Michaelis-Menten 方程时).

当 $v = 0.5V_{\text{最大}}$; $0.5K' + 0.5[S]_{0.5}^n = [S]_{0.5}^n$ 时,

$$K' = [S]_{0.5}^n$$

$$[S]_{0.5} = \sqrt[n]{K'} \quad \text{或} \quad n \log [S]_{0.5} = \log K' \quad (70)$$

如果协同性不是很高, 该速度方程将不简化为希尔方程. 尽管如此, 速度曲线仍可用希尔方程表示, 虽然 n 不再等于结合部位的数目. 在这种情况下, “ n ”须标示为 n 表观值或 n_H .

例如,如果协同性 10% 和 90% $V_{\text{最大}}$ 之间存在的主要类型为 ES_3 和 ES_4 , 那样则所得到的速度数据设取 n 为 3 和 4 之间的某些非整数(例如, $n=3.6$)就可使之适合希尔方程. 换个方式来说,如果根据希尔方程分析实验数据,所计算出的 n 值几乎总是小于实际结合部位的数目. 在这个表观的 n 值以上,下一个最高整数代表了实际结合部位的最小数目. 因此,如果根据希尔方程实验数据给出 1.8 的 n ,我们实际上就可以说,该酶表现的正象恰好具有 1.8 个协同性很强的底物结合部位. 我们知道最低限度有两个部位,具有比较强的协同性,但是也可能恰好是四个具有弱的协同性的部位,或者许多部位以高度协同成对的方式起作用.

速度曲线的 S 形性质

v 对 $[S]$ 曲线的形状可以用 $V_{\text{最大}}$ 的任何两部分所需的底物浓度之比表示. 例如, $0.9V_{\text{最大}}$ 和 $0.1V_{\text{最大}}$, 这个比率称为协同性的指标,取决于 n 值,表示如下:

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[S]^n}{K' + [S]^n}$$

当 $v=0.9V_{\text{最大}}$ 时; $0.9 = \frac{[S]_{0.9}^n}{K' + [S]_{0.9}^n}$ $[S]_{0.9} = \sqrt[n]{9K'}$

当 $v=0.1V_{\text{最大}}$ 时; $0.1 = \frac{[S]_{0.1}^n}{K' + [S]_{0.1}^n}$ $[S]_{0.1} = \sqrt[n]{K'/9}$

$$\therefore \frac{[S]_{0.9}}{[S]_{0.1}} = \frac{\sqrt[n]{9K'}}{\sqrt[n]{K'/9}} = \sqrt[n]{9K'/K'/9}$$

$$\frac{[S]_{0.9}}{[S]_{0.1}} = \sqrt[n]{81} \quad \text{或} \quad n = \frac{\log 81}{\log \frac{[S]_{0.9}}{[S]_{0.1}}} \quad (71)$$

图 4-51 表示不同的相互作用系数,对别构四聚体速度曲线的影响. 当相互作用系数降低(即当协同性增大时),曲线变得更加 S 状而且 $[S]_{0.5}$ 降低.

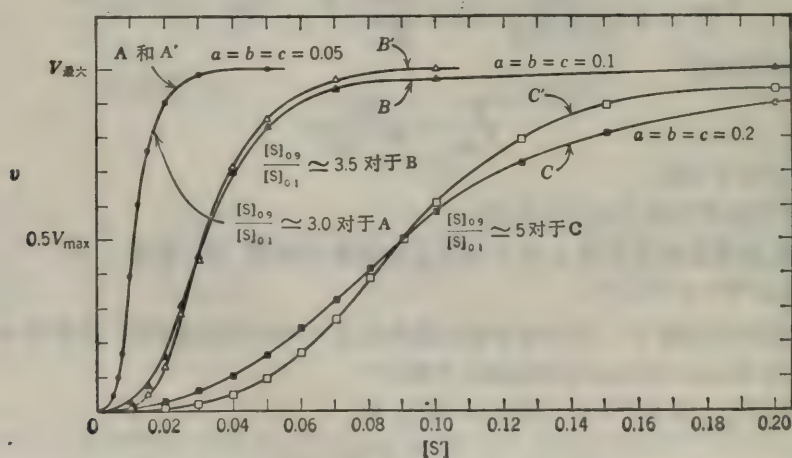


图 4-51 相互作用系数对 S 形性质和四部位酶的 $[S]_{0.5}$ 的影响. 曲线 A: $a=b=c=0.05$, 曲线 B: $a=b=c=0.1$, 曲线 C: $a=b=c=0.2$, 曲线 A、B 和 C 是用全速方程计算的; 曲线 A'、B' 和 C' 是用相应的希尔方程计算的(即,仅考虑相当于 E 和 ES_4 项).

希尔作图法——希尔方程的对数形式

希尔方程可变换为有用的直线形式,如下所示:

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[S]^n}{K' + [S]^n} \quad V_{\text{最大}}[S]^n = vK' + v[S]^n$$

$$[S]^n(V_{\text{最大}} - v) = vK' \quad \frac{[S]^n(V_{\text{最大}} - v)}{v} = K'$$

$$n \log [S] + \log \frac{V_{\text{最大}} - v}{v} = \log K'$$

$$\log \frac{V_{\text{最大}} - v}{v} = \log K' - n \log [S]$$

或 $\log \frac{v}{V_{\text{最大}} - v} = n \log [S] - \log K' \quad (72)$

于是, $\log v/(V_{\text{最大}} - v)$ 对 $\log [S]$ 的图型是一条直线,斜率为 n (图 4-52)。当 $\log v/(V_{\text{最大}} - v) = 0$ 时, $v/(V_{\text{最大}} - v) = 1$ 以及在 $\log [S]$ 轴的相应位置为 $\log [S]_{0.5}$ 。 K' 可从 $K' = \frac{v}{[S]^n}$ 关系式中计算出来。在理论上,希尔图线在底物浓度整个范围内是一条直线(根据设 E 和 E_n 之间没有中间物存在的推导)。希尔图线随着实验数据在低比速下通常是偏离线性关系的,届时,反应中含有少于 n 分子底物的复合体,对初速度影响很大。在很低的底物浓度下(在实验上也许永不会观察到)的该极限斜率是 1。另一方面,如果这种酶含有非催化的调节部位,必须在底物能结合到催化部位之前占用时,希尔图线的斜率将随底物减少而增加。在很低的 $[S]$ 时,该斜率约等于任何反应出现之前必须占用的部位的数目。

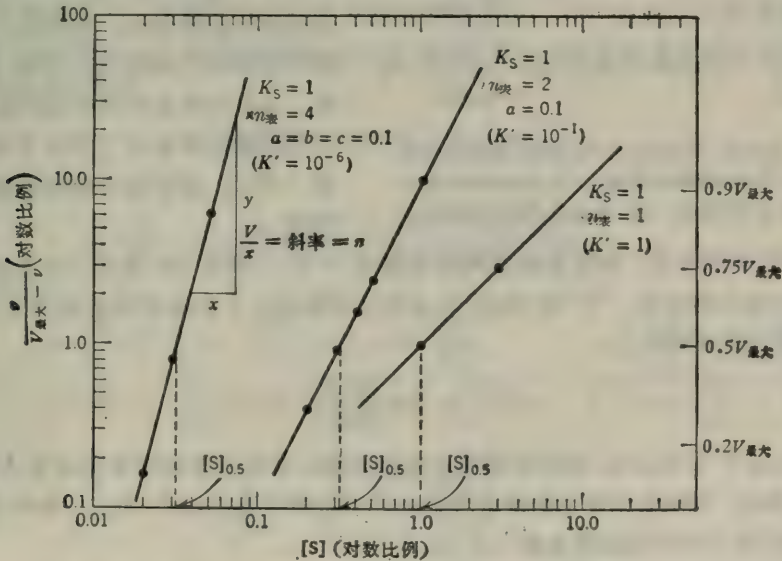


图 4-52 希尔作图法为具有不同 n 值和相同的固有 K_S 的酶。

希尔线图可用 $\log v/(V_{\text{最大}} - v)$ 对 $\log [S]$ 按线性比例作图。然后,斜率(n)就可以直接从曲线上读出。然而,通常直接按 \log - \log 比例标绘 $v/(V_{\text{最大}} - v)$ 对 $[S]$ 线图更为方便。如果两个轴上的 \log - \log 比例的十进位是相同,就可以用一把直尺通过测量相应的垂线和水平线距离的方法测定斜率。

协调变换或对称性模型

Monod, Wyman 和 Changeux 于 1965 年为别构蛋白质提出了一个极好的模型。这个模型的特点是：(a) 别构蛋白质是聚合体(低聚物)含有以对称方式排列着的相同极小单位(原体)。 (b) 每个相同的原体具有一个, 而且仅仅是一个, 与任一给定配体(底物、抑制剂、活化剂)结合的部位。 (c) 低聚物能以两种不同构象存在于平衡中。不同的构象可来自原体四级结构的重新排列或三级结构的变化(或两者)。一种构象和另一种构象间的转换是全变或全然不变, 即, 在转换中低聚物的对称性是不变的。因此, 并不存在着某些原体在空间上已重新排列了或在构象上已改变了而其他原体无变化的混合状态。(a) 结合部位对给定配体的亲和力取决于原体的构象(因此, 依据低聚物的构象)。有些配体优先地结合到一种低聚物的构象上, 而另一些配体则优先地结合到另一种低聚物构象上。配体结合到一个特殊的构象上将引起平衡趋向于带有结合配体的构象方面移动。因为每个低聚物有一个以上的配体结合部位(每个原体有一个结合部位)而且对所有原体来说, 从亲和力较低的构象转换为亲和力较高的构象都是同时发生的, 通过转换亲和力较高的结合部位变成可利用的数目超过了已用尽的部位的数目。因此, 配体结合曲线或速度曲线是 S 形的。

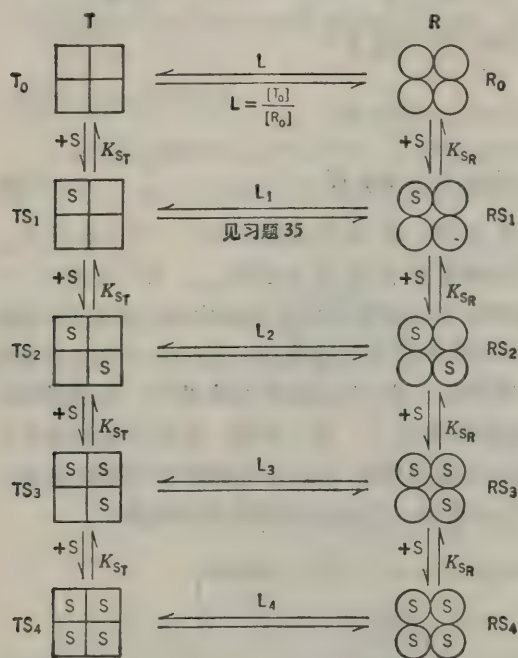


图 4-53 Monod, Wyman 和 Changeux 的协调-对称模型。T 代表低聚物酶的低亲和力型, 它与该酶的高亲和力型 R 处于平衡中。这个模型只适于正协同性。

图 4-53 图解说明了四聚体的协调对称模型。“T”(“绷紧”或“紧张”)状态表示对配体 S 具有较低亲和力的构象。“R”(“松弛的”)状态表示该构象对 S 具有较高的亲和力。 $R_0 \rightleftharpoons T_0$ 转换的平衡常数表示为 L。

$$L = \frac{[T_0]}{[R_0]} \quad (73)$$

在原体处于 T 状态时, 底物在原体上的结合部位的固有解离常数标示为 K_{ST} 。在原体处于 R 状态时, 底物在原体上的结合部位的固有解离常数标示为 K_{SR} 。比率 K_{SR}/K_{ST} 标示为 c 称做“非排斥性的结合系数”。

底物结合的协同性取决于 L 和 c。当 L 增加时(即 $R_0 \rightleftharpoons T_0$ 的平衡趋向于 T_0)和 c 减小时(即当 T 状态的亲和力与 R 状态对 S 的亲和力相比是降低的)速度曲线就变得更为 S 形。别构抑制剂是假定了优先地与 T 状态结合, 因而移动了 $T_0 \rightleftharpoons R_0$ 平衡趋向于 T_0 (图 4-54)。事实上, 随着 n_* (来自希尔线图) 接近部位的实际数目时, 别构常数 L 就增加而且速度曲线变得更加 S 形了。活化剂是假定了优先结合到 R 状态, 于是以移动 $T_0 \rightleftharpoons R_0$

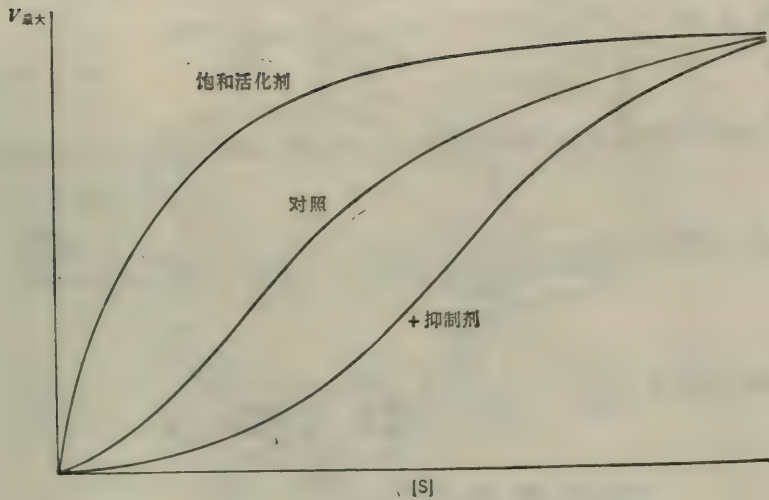


图 4-54 按照协同对称模型, 别构抑制剂优先结合到 T 型。这种结合引起了速度曲线变得更加 S 形, 具有一个较高的 $[S]_{0.5}$ 。别构活化剂以优先地结合到 R 型上模拟了底物, 结果速度曲线的弯度减小(在饱和活化剂下为双曲线形)而且 $[S]_{0.5}$ 减少。这些观察也可用序列相互作用模型解释。

平衡趋向右边的方式而模拟了底物。结果速度曲线的 S 形弯曲度减小了。在活化剂无限高的浓度下所有的酶都将推向 R 状态, 而 v 对 $[S]$ 曲线变为双曲线型。

图 4-55 图解说明了二聚体协调对称模型的最简单形式。“T”状态对底物 S 是假定了绝对没有亲和力的(即 $c=0$), 即底物排斥地与 R 状态结合, 其解离常数可简单地用 K_s 表示。该速度可由下式表示:

$$v = k_p[RS] + k_p[SR] + 2k_p[RS_2]$$

除以 $[E]_t$:

$$\frac{v}{[E]_t} = \frac{k_p[RS] + k_p[SR] + 2k_p[RS_2]}{[T_0] + [R_0] + [RS] + [SR] + [RS_2]}$$

用 $[R_0]$ 取代 $[RS]$ 等:

$$\frac{v}{[E]_t} = \frac{k_p \frac{[S]}{K_s} [R_0] + k_p \frac{[S]}{K_s} [R_0] + 2k_p \frac{[S]^2}{K_s^2} [R_0]}{L[R_0] + [R_0] + \frac{[S]}{K_s} [R_0] + \frac{[S]}{K_s} [R_0] + \frac{[S]^2}{K_s^2} [R_0]} = \frac{2k_p \frac{[S]}{K_s} + 2k_p \frac{[S]^2}{K_s^2}}{L + 1 + 2 \frac{[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{K_s^2}}$$

或

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{\frac{[S]}{K_s} \left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)}{L + \left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)^2} \quad (74)$$

式中, $V_{\text{最大}} = 2k_p[E]_t$ 。

通式:

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{\frac{[S]}{K_s} \left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)^{n-1}}{L + \left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)^n} \quad (75)$$

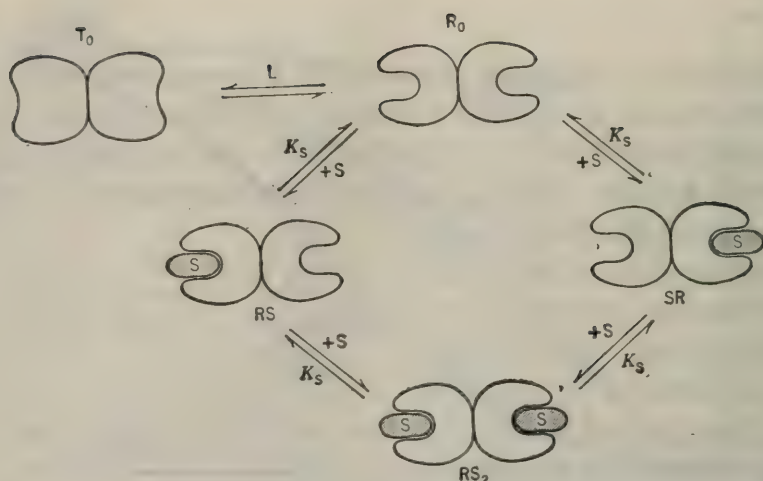


图 4-55 别构二聚体的协调对称模型, 其中 S 专一地结合到 R 上 ($c=0$)。

方程 (75) (同所有其他从快速平衡假定中推导一样) 才是给出占用部位对总部位比率的平衡结合方程式。根据速度与占用部位成比例的假定, 我们得到了速度方程, 换句话说, 当我们使 Y_S 等于 $v/V_{\text{最大}}$ 时可得到的速度方程为

$$Y_S = \frac{[\text{占用部位}]}{[\text{总部位}]} = \frac{[\text{结合的 S}]}{n[E]_t} = \frac{v}{V_{\text{最大}}} \quad (76)$$

例题 4-26

某个遵循 S 形动力学的酶, 其 $[S]_{0.9}/[S]_{0.1}$ 比率是 6.5, $n_{\text{表}}$ 值是多少?

解:

$$\begin{aligned} \frac{[S]_{0.9}}{[S]_{0.1}} &= \sqrt[n]{81} & n &= \frac{\log 81}{\log \frac{[S]_{0.9}}{[S]_{0.1}}} \\ n &= \frac{\log 81}{\log 6.5} = \frac{1.91}{0.813} = 2.35 \\ n_{\text{表}} &= 2.35 \end{aligned}$$

例题 4-27

计算具有 $n_{\text{表}}$ 值为 2.6 的某个遵循 S 形动力学曲线酶的比率 $[S]_{0.9}/[S]_{0.1}$?

解:

当 $n_{\text{表}} = 2.6$ 时,

$$\begin{aligned} \frac{[S]_{0.9}}{[S]_{0.1}} &= \sqrt[2.6]{81} = 81^{\frac{1}{2.6}} \\ \log \frac{[S]_{0.9}}{[S]_{0.1}} &= \frac{1}{2.6} \log 81 = (0.385)(1.91) = 0.735 \\ \frac{[S]_{0.9}}{[S]_{0.1}} &= 5.43 \end{aligned}$$

例题 4-28

当按照序列相互作用模型分析时, 某个变构二聚体的相互作用系数 a 为 0.2 (即 S 的第一个

分子的结合以系数 5 增大了空位的结合常数——空位的解离常数减少到原值的 0.2)。

(a) 在 $[S] = 0.3K_s$ 时, 酶形式的相对分布如何? (b) 在 $[S] = 0.3K_s$ 时, 比速是多少? (c) $n_{\text{表}}$ 的计算值等于 2 吗?

解:

(a) 酶形式间的平衡表示在图解 (66) 中。下面给出相对分布, 其中每一项代表一种形式的酶的浓度和自由 E 的比较。

$$\frac{[E]}{[E]_t} = \frac{1}{1 + \frac{2[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{aK_s^2}} = \frac{1}{1 + 0.6 + \frac{0.09}{0.2}} = \frac{1}{2.05} = 0.488 = 48.8\%$$

$$\frac{[ES]}{[E]_t} = \frac{\frac{[S]}{K_s}}{1 + \frac{2[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{aK_s^2}} = \frac{0.3}{1 + 0.6 + 0.45} = \frac{0.3}{2.05} = 0.146 = 14.6\%$$

$$\frac{[SE]}{[E]_t} = \frac{[ES]}{[E]_t} = \frac{0.3}{2.05} = 0.146 = 14.6\%$$

$$\frac{[SES]}{[E]_t} = \frac{\frac{[S]^2}{aK_s^2}}{1 + \frac{2[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{aK_s^2}} = \frac{0.45}{2.05} = 0.220 = 22.0\%$$

$$(b) \quad \frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{\frac{[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{aK_s^2}}{1 + \frac{2[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{aK_s^2}} = \frac{0.3 + 0.45}{2.05} = \frac{0.75}{2.05} = 0.366 \quad v = 0.366 V_{\text{最大}}$$

(c) 按照 (b) 部分给出的方程作出的速度曲线是 $[S]_{0.1} \approx 0.09K_s$ 和 $[S]_{0.9} \approx 2.5K_s$ 的 S 形曲线。从这个比率 (或从希尔线图的斜率介于 $V_{\text{最大}}$ 的 10% 和 90% 间相应点或是从 $0.5V_{\text{最大}}$ 范围的斜率) 计算的 $n_{\text{表}}$ 值大约是 1.3。该 $n_{\text{表}}$ 值比真正的 n 值小, 因为复合体 ES 和 SE 在绝大部分的速度曲线中提供了相当数量的观察速度 (例如, 在 $v = 0.366V_{\text{最大}}$ 时, ES+SE 的总量为总酶量的 29.2%, 而此时 SES 的总量仅为总酶量的 22%)。假如 α 是很小的 (如 0.02), 那么酶的大部分将以 E 或 SES 的形式存在, 而且 $n_{\text{表}}$ 值将接近 2。

K. 酶的转换

反馈抑制、激活和变构现象在所有类型的细胞中是调节酶活力的极为快速的方式。酶合成的遏制和诱导 (或抑郁) 表现为较缓慢的, 长期的调节方法从而使在细胞内特殊酶的数量为最适宜的。在微生物的细胞中, 不再需要的酶就随细胞的生长而受到遏制和冲淡减弱。在相对地生长缓慢的高等生物细胞中, 特别是在动物细胞中, 酶的直接降解常常代替了冲淡作用。事实上, 在动物细胞中许多酶的水平是由酶的合成和降解间的平衡来控制的。这种恒定的合成和降解称做转换。酶的合成是零级反应过程, 酶的降解一般遵循一级动力学, 即, 降解速率与酶存在的浓度成比例。下面的例题说明了合成速率和降解速率两者之间的关系以及酶的稳态水平。

例题 4-29

肝脏的某种特殊酶,以每分钟每克组织用 12.5 个单位的恒定速度合成。这种酶的稳态水平是每克组织 250 个单位。(a)计算转换的降解阶段的一级速度常数?(b)施用激素后酶合成的速率增加了六倍,但不影响降解的一级速度常数,过了一会,该酶达到了新的稳态水平。降解的新速度是多少?酶的新稳态水平是多少?

解:

(a) 为了保持 $[E]_t$, 在每克组织中 250 单位, 降解的速度必须等于合成的恒定速度。

$$v_{\text{合成}} = v_{\text{降解}} = k[E]_t$$

$$12.5 = 12.5 = k[E]_t$$

$$k = \frac{12.5}{[E]_t} = \frac{12.5}{250}$$

$$k = 0.05 \text{ 分}^{-1}$$

即每分钟转换稳态水平的 5%。

(b) 假如 $v_{\text{合成}}$ 增加了六倍为 $6 \times 12.5 = 75$ 单位 \times 克组织 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$, 那么 $v_{\text{降解}}$ 也必需是 75 单位 \times 克组织 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$ 以维持新的稳态水平。如果 k 是不变的:

$$75 = 0.05[E]_t \quad \text{或} \quad [E]_t = \frac{75}{0.05}$$

$$[E]_t = 1500 \text{ 单位/克组织}$$

于是, 假如 k 保持恒定, 酶的合成速度方面增加了六倍时, 稳态酶的水平也增高六倍。

一般参考文献

酶的动力学

Segel, I. H., 酶的动力学: 快速平衡和稳态酶系的行为和分析。Wiley-Interscience(1975)。

这本书象生物化学计算一样, 由基础水平开始并逐步引深到多反应物酶的稳态动力学、别构酶、同位素交换和膜运载等近代课题。

普通酶学

Whitaker, J. R., *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. Marcel Dekker(1972)。

酶的机制

Bernhard, S., *The Structure and Function of Enzymes*. Benjamin(1968)。

Gray, C. J., *Enzyme-Catalyzed Reactions*. Van Nostrand-Reinhold(1971)。

Jencks, W. P., *Catalysis in Chemistry and Enzymology*. McGraw-Hill(1969)。

Westley, J., *Enzyme Catalysis*. Harper and Row(1969)。

Zeffren, E. and P. L. Hall, *The Study of Enzyme Mechanisms*. Wiley-Interscience(1973)。

练习题

答案见第 308—311 页。

1. 下面表示的浓度-速度数据, 是从酶促 $S \rightarrow P$ 反应得到的。(a)计算 K_m 和 $V_{\text{最大}}$; (b)证明该酶遵循双曲线饱和和动力学; (c)计算使用不同酶浓度的一级速度常数。

[S]	v	[S]	v
M	(纤摩尔 \times 升 $^{-1}\times$ 分 $^{-1}$)	M	(纤摩尔 \times 升 $^{-1}\times$ 分 $^{-1}$)
2.50×10^{-6}	24	2×10^{-5}	80
3.33×10^{-6}	30	4×10^{-5}	96
4.0×10^{-6}	34	1×10^{-4}	109
5×10^{-6}	40	2×10^{-3}	119
1×10^{-5}	60	1×10^{-2}	120

2. 对 K_m 为 $2.4\times 10^{-4}M$ 的酶, 在下列底物浓度下进行试验: (a) $2\times 10^{-7}M$, (b) $6.3\times 10^{-5}M$, (c) $10^{-4}M$, (d) $2\times 10^{-3}M$ 和 (e) $0.05M$. 在 $0.05M$ 时观测到的速度是 128 纤摩尔 \times 升 $^{-1}\times$ 分 $^{-1}$. 计算在其他底物浓度下的初速度?

3. 假如将习题 2 中的酶浓度增高 5 倍, 在给定的每个底物浓度下初速度应该是多少?

4. 反应 $S \xrightleftharpoons{E} P$ 的平衡常数是 2×10^3 . 酶 E 催化这个反应 ($K_{ms}=2.5\times 10^{-5}M$, $V_{最大f}=4.2$ 微摩尔 \times 升 $^{-1}\times$ 分 $^{-1}$). (a) 正反应的一级速度常数是多少? (b) 逆反应的一级速度常数是多大? (c) $V_{最大r}/K_{mP}$ 的比率是多大?

5. 某酶催化 $S \rightleftharpoons P$ 的反应 ($V_{最大f}=22$ 微摩尔 \times 升 $^{-1}\times$ 分 $^{-1}$, $V_{最大r}=14$ 微摩尔 \times 升 $^{-1}\times$ 分 $^{-1}$). 如果 $[S]=2K_{ms}$, $[P]=7K_{mP}$ 时, 该反应将以什么样的方向和速度进行呢?

6. 某个酶的 K_m 为 $1.2\times 10^{-4}M$, 在初始底物浓度为 $0.02M$ 中进行试验. 30 秒钟内, 生成的产物为 2.7 微摩尔/升. 多少产物会生成于 (a) 1 分钟, (b) 95 秒种, (c) 3 分钟和 (d) 5.3 分钟? (e) 按照上述指出的时间内, 原来底物利用的百分数是多少?

7. K_m 为 $2.6\times 10^{-3}M$ 的某酶, 在最初底物浓度为 $0.3M$ 中进行试验. 观测到的速度是 5.9×10^{-5} 摩尔 \times 升 $^{-1}\times$ 分 $^{-1}$. 如果最初底物浓度是 $2\times 10^{-5}M$, 在 (a) 5 分钟后和 (b) 10 分钟后, 产物的浓度将是多大?

8. K_m 为 $3\times 10^{-4}M$ 的某酶, 在一个最初底物浓度为 $10^{-6}M$ 中进行试验. 1 分钟内已用尽该底物的 5.0%. (a) 5 分钟内, 用尽底物的百分数会是多少? (b) 如果最初底物的浓度是 $8\times 10^{-7}M$, 5 分钟内用尽的底物的百分数是多少? (c) 计算 $V_{最大}$; (d) 在底物浓度为 $8\times 10^{-7}M$ 时, 用尽底物的 50% 需多长时间? (e) 在底物浓度为 $10^{-6}M$ 时, 用尽底物的 75% 需多长时间?

9. 计算遵循双曲线饱和和动力学的某酶的下列比速度: (a) $[S]_{0.95}/[S]_{0.05}$, (b) $[S]_{0.80}/[S]_{0.20}$, (c) $[S]_{0.75}/[S]_{0.25}$, (d) $[S]_{0.75}/[S]_{0.5}$?

10. 倒数线图的 $1/v$ 轴, 标示为 v^{-1} : (纤摩尔 \times 升 $^{-1}\times$ 分 $^{-1}$) $^{-1}\times 10^2$. $1/[S]$ 轴标示为 $[S]^{-1}$: (M) $^{-1}\times 10^{-4}$. 线图分别交这两个轴于“2”和“-4”处. 最大速度和 K_m 是多少?

11. 从脑组织中分离出一种吗啡结合物. 这种物质经提纯到均一性并鉴定为糖蛋白质, 其分子量是 260,000. 这种糖蛋白溶液 (0.30 毫克/毫升用等体积的 3H -吗啡溶液进行透析. 在平衡时, 含有糖蛋白的容器中的所有总 (结合的+游离的) 3H -吗啡量为 $1.43\times 10^{-6}M$. 不含糖蛋白容器中的吗啡量为 $0.78\times 10^{-6}M$. 计算 (a) 结合的 3H -吗啡浓度, (b) 游离的蛋白质浓度, 和 (c) 糖蛋白-吗啡复合物的解离常数. 假定每个蛋白质分子有一个结合部位.

12. 胚胎的肝组织中, 含有一种催化 $S\rightarrow P$ 反应的酶. 成年人的肝组织也显示了催化 $S\rightarrow P$ 的活力, 一些动力学数据表示如下, 你能对这两种酶在一致性方面得出什么结论?

[S]	观测的初速度 (微摩尔 \times 毫克蛋白质 $^{-1}\times$ 分 $^{-1}$)		[S]	观测的初速度 (微摩尔 \times 毫克蛋白质 $^{-1}\times$ 分 $^{-1}$)	
(M)	成年人肝的提取物 (E_1)	胚胎肝的提取物 (E_2)	(M)	成年人肝的提取物 (E_1)	胚胎肝的提取物 (E_2)
1.67×10^{-5}	1.05	5.00	1.0×10^{-4}	5.00	13.33
2.5×10^{-5}	1.54	6.66	1.5×10^{-4}	6.67	15.00
3.33×10^{-5}	1.98	8.00	1.67×10^{-4}	7.15	15.4
5.0×10^{-5}	2.86	10.00	2.0×10^{-4}	8.00	16.00
7.0×10^{-5}	3.78	11.67	3.0×10^{-4}	10.00	17.1

13. 在严重的肝损伤期间, 某种酶(习题 12 中的 E_1) 释放到了血液中. 剧烈运动后, 催化同样反应的肌肉酶(E_2)释放到了血液中. 因为 E_1 和 E_2 有不同的 K_m 值, 区别它们是很容易的(肌肉酶的 K_m 是 $2 \times 10^{-5} M$). 某患者的血液样品化验结果如下:

[S]	v	[S]	v
(M)	(微摩尔×血清毫升 ⁻¹ ×分 ⁻¹)	(M)	(微摩尔×血清毫升 ⁻¹ ×分 ⁻¹)
5×10^{-5}	43	2×10^{-4}	120
7×10^{-5}	57	3×10^{-4}	150
1×10^{-4}	75	6×10^{-4}	200
1.5×10^{-4}	100		

- 该患者是患肝病呢, 还是仅仅运动过度呢? (患者到医院时已失去知觉, 所以不能问他任何问题.)
14. 计算在下述条件下, 由竞争性抑制剂所引起的 v_i 和抑制程度: (a) $[S]=2 \times 10^{-3} M$ 和 $[I]=2 \times 10^{-3} M$, (b) $[S]=4 \times 10^{-4} M$ 和 $[I]=2 \times 10^{-3} M$ 和 (c) $[S]=7.5 \times 10^{-3} M$, $[I]=10^{-5} M$. 假定 $K_m=2 \times 10^{-3} M$, $K_i=1.5 \times 10^{-4} M$ 而 $V_{\text{最大}}=270$ 纤摩尔 \times 升⁻¹ \times 分⁻¹.
15. (a) 如果 $K_m=2.9 \times 10^{-4} M$, $K_i=2 \times 10^{-5} M$, 在底物浓度为 $1.5 \times 10^{-3} M$ 时, 要得到 75% 的抑制需要竞争性抑制剂的浓度是多少? (b) 为了使速度达到原来没有被抑制的值, 底物的浓度必需增加多少?
16. 假设 $2 \times 10^{-4} M$ 的 $[I]$ 抑制了一个酶催化反应的 75%, 计算这个非竞争性抑制剂的 K_i ?
17. 在底物为 $6 \times 10^{-4} M$ ($K_m=10^{-3} M$), 非竞争性抑制剂为 $2.5 \times 10^{-4} M$ ($K_i=3 \times 10^{-5} M$) 时, $V_{\text{最大}}$ 为 515 纤摩尔 \times 升⁻¹ \times 分⁻¹. 计算(a)酶催化反应的速度和(b)抑制的程度?
18. 为了观测给定的速度, 在有竞争性抑制剂存在时底物浓度需要的 $[S]_i$ 与没有竞争性抑制剂存在时底物浓度需要的 $[S]_0$ 两者之间有什么关系?
19. 根据下面所得到的数据, 确定每种抑制剂的性质并计算 K_i ?

初速度(纤摩尔/分)					
[S] (mM)	(对照)	+I 为 $6 \mu M$	+X 于 $30 \mu M$	+Y 于 $4 mM$	+Z 于 $0.2 mM$
0.200	16.67	6.25	5.56	10.00	8.89
0.250	20.00	7.69	6.67	11.11	10.81
0.333	24.98	10.00	8.33	12.50	13.78
0.500	33.33	14.29	11.11	14.29	19.05
1.00	50.00	25.00	16.67	16.67	30.77
2.00	66.67	40.00	22.22	18.18	44.44
2.50	71.40	45.45	23.81	18.52	48.78
3.33	76.92	52.63	25.64	18.87	54.06
4.00	80.00	57.14	26.67	19.00	57.14
5.00	83.33	62.50	27.77	19.23	60.60

20. 单单反应的产物 P 的作用对于 S 象一个竞争性抑制剂(P 和 S 两者对游离 E 竞争)假如 $K_{\text{平}}$ 是很大的($V_{\text{最大}}$ 是很小的), 正反应的速度方程是:

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[S]}{K_{mS} \left(1 + \frac{[P]}{K_{mP}}\right) + [S]}$$

假定有一个体系, 其 $[S]+[P]$ 的总合并量是恒定的, 并且等于 $10^{-3} M$, $K_S=10^{-4} M$, $K_P=10^{-5} M$, $V_{\text{最大}}=100$ 纤摩尔 \times 升⁻¹ \times 分⁻¹. v 对 $[S]$ 的线图象什么样呢? 记住 $[S]+[P]=10^{-3} M$. 这样, 当 $[S]=10^{-4} M$ 时, $[P]=9 \times 10^{-4} M$; 在 $[S]=2 \times 10^{-4} M$ 时, $[P]=8 \times 10^{-4} M$, 等等.

21. 某酶的底物是弱酸性($pK_a=4.5$) 的 A^- 离子. 该酶的活性部位含有必须质子化才出现活性的组氨酸残基($pK_a=6.5$). 这个反应的最适 pH 是多少?

22. 一个酯酶的活性部位, 含有酸性氨基酸残基和碱性氨基酸残基。只有当部位以 $^+HN-ES-COO^-$ 形式存在时才能与底物结合。于是, 当 $^+HN-ES-COOH$ 和 $N-ES-COO^-$ 的形式不存在时, 能产生的形式就是 $^+HN-ES-COO^-$ 。两个残基的 pK 是 4.0(pK_{a1}) 和 7.0(pK_{a2})。 (a) 最适 pH 是多少? (b) 写出表示 $[H^+]$ 影响 v 的速度方程式。

23. $V_{\text{最大}}$ 在 21°C 和 37°C 时分别是 140 纤摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$ 和 400 纤摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$ 。计算 25°C 和 35°C 之间的 (a) 活化能和 (b) Q_{10} 值?

24. 大肠杆菌无细胞提取液, 每毫升含 24 毫克蛋白质。20 微升的这种提取液在 0.1 毫升的标准保温体积中, 以 1.6 纤摩尔/分的速度催化从葡萄糖-1-磷酸- ^{14}C 的葡萄糖- ^{14}C 掺入糖原。计算反应速度, 以下列单位表示: (a) 微摩尔/分, (b) 微摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$, (c) 微摩尔 \times 毫克蛋白质 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$ 。并以 (d) 单位/毫升和 (e) 单位/毫克蛋白质为单位计算提取液中磷酸化酶的活力?

25. 50 毫升上述无细胞提取液, 用硫酸铵沉淀法进行分级分离。在硫酸饱和度为 30%—50% 之间的沉淀组分, 重新溶解在 10 毫升的总体积中并进行透析。透析后溶液的体积为 12 毫升, 而且每毫升溶液含蛋白质 30 毫克。20 微升这种被提纯的部分在标准试验条件下, 以每分钟 5.9 纤摩尔的速度催化上述磷酸化酶的反应。计算 (a) 该酶的回收率和 (b) 从硫酸铵分级步骤中得到的提纯程度?

26. 某纯酶的比活力为 120 单位/毫克蛋白质。 (a) 如果该酶的分子量为 360,000, 计算其转换数? (b) 计算一个催化周期所需的时间?

27. (a) 在 25 分钟内要用尽 $8 \times 10^{-3}M$ 的葡萄糖的 95%, 必须向 1 毫升总反应体积中加己糖激酶多少个单位? $K_m = 4.7 \times 10^{-4}M$ 。 (b) 每毫升一个单位的酶用尽同样数量的葡萄糖需多长时间?

28. 计算在 $[A] = 2 \times 10^{-5}M$, $[B] = 6.7 \times 10^{-5}M$ 时, 酶催化 $A + B \rightarrow P + Q$ 的反应速度? 假定 A 和 B 是随意加到酶中的, 而且 (a) $\alpha = 1$ (一个底物的结合不影响另一个底物的结合), (b) $\alpha = 0.1$ (一个底物的结合使另一个底物以系数 10 降低解离常数)。预先试验确定 $K_A = 2.2 \times 10^{-4}M$, $K_B = 1.9 \times 10^{-5}M$, 而 $V_{\text{最大}} = 72.7$ 纤摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$ 。

29. 重新整理稳态有序二反应物系统的速度方程以表示 $v/V_{\text{最大}}$ 为 (a) $[A]$ 是在 B 的不同固定浓度下变化的 (b) $[B]$ 是在 A 的不同固定浓度下变化的。

30. 快速平衡有序二反应物系统的倒数线图与稳态有序二反应物系统的倒数线图是如何不同的?

31. 要得到一个显示正-负-正协同性的别构四聚体的速度曲线, 所需的 α 、 b 和 c (相互作用因数) 的相对值是多少?

32. 下面的数据得自某酶促反应。确定这个酶是遵循双曲线动力学, 还是遵循 S 形的动力学, 以及计算或估算恰当的动力学常数 (K_m 和 $V_{\text{最大}}$ 或 K' , $[S]_{0.5}$, $n_{\text{表}}$ 和 $V_{\text{最大}}$)?

最初底物浓度	初 速 度	最初底物浓度	初 速 度
($M \times 10^4$)	(微摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$)	($M \times 10^4$)	(微摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$)
6.25	1.54	100.0	80.0
12.5	5.88	200.0	94.12
25.0	20.0	400.0	98.46
50.0	50.0	800.0	99.61

33. (a) 假如 $[S]_{0.9}/[S]_{0.1}$ 是 9, 酶的 $n_{\text{表}}$ 值是什么? (b) 当 $n_{\text{表}} = 4$ 时, 计算别构酶的 $[S]_{0.9}/[S]_{0.1}$ 的比率?

34. 假如当 $[S]/K_s = 5$ 时, $v/V_{\text{最大}} = 0.35$, 这个别构二聚体 ($n = 2$) L 值是多少? 假定 $c = 0$ 。

35. 在部分填满的复合物中协调-对称模型并不妨碍 $T \rightleftharpoons R$ 的转换。如果 L_1 定义为 $[TS]/[RS]$,

而 L_2 定义为 $[TS_2]/[RS_2]$, 用 L 和 c 表示 L_1 和 L_2 的值是什么? 参考图 4-53.

36. 吃自然(天然)食物的鼠肝中, 某特殊酶的水平是每克组织 1500 单位. 经研究找出了该酶降解的一级速度常数是 0.03 分^{-1} . (a) 计算该酶合成的零级速度? (b) 当用全部是合成的食物饲养大鼠时, 上述酶的稳态水平降低到 848 单位/克组织. 如果酶的合成速度不受食物的影响, 酶降解的新一级速度常数必须是多少? (c) 如果酶降解的一级速度常数不受食物的影响(仍保持 0.03 分^{-1}), 为了保持 $[E]_0$ 为 848 单位/克组织的新水平, 酶合成的新零级速度必须是多少?

再参阅在“分光光度法和其他光学方法”及“同位素在生物化学中”的章节中有关酶实验的习题.

(张光兴、张增第译 董振芳、吴经才校)

第五章 分光光度法及其它光学方法

A. 分光光度法

电磁能的吸收

分光光度法(光吸收或光透过的测定法)是生物化学家使用的最有价值的分析方法之一。未知物质可通过它们吸收紫外光、可见光或红外光的特有光谱来加以鉴定。溶液中已知化合物的浓度可在一种或多种波长下,测定溶液的光吸收来确定。用分光光度法测定产物的出现或底物的消失,常可对酶促反应进行跟踪。

在电磁波的不同区域,光吸收的物理现象基础见表 5-1。

表 5-1

区 域 波 长	X-光 0.1—100 nm	紫 外 100—400 nm	可 见 400—800 nm	红 外 800 nm—100 μm	微 波 100 μm —30 cm
对分子的影响	激发到更高能级的次层价电子	激发到更高能级的价电子		分子振动	分子转动

有些书将 1 nm(纤米= 10^{-9} 米)叫做 1 m μ (毫微米); 1 μm (微米= 10^{-6} 米)叫做 1 微米。1 埃(\AA)为 10^{-10} 米= 10^{-8} 厘米。红外辐射有时用波数(厘米 $^{-1}$)来表示。波数是以厘米为单位的波长的倒数。辐射也常用它的频率来描述。频率和波长都与光速有关,光速为一常数。

$$\lambda\nu = c \quad (1)$$

式中, λ =波长(以厘米为单位),

ν =频率(以秒 $^{-1}$ 为单位),和

c =光速(3×10^{10} 厘米/秒)。

ν 的单位为秒 $^{-1}$, 意为每秒振动的次数。]

例题 5-1

某滤光器只使平均波长为 6500 \AA 的远红外光通过。计算: (a) 波长, 用纤米和厘米表示, (b) 波数, 用厘米 $^{-1}$ 表示, 和 (c) 频率。

解:

$$(a) \quad 6500 \text{ \AA} = 6500 \times 10^{-10} \text{ 米} = 650 \times 10^{-9} \text{ 米}$$

$$\lambda = 650 \text{ nm} \quad \text{或} \quad \lambda = 6.50 \times 10^{-5} \text{ 厘米}$$

$$(b) \quad \text{波数} = 1/\lambda = 1/(6.50 \times 10^{-5} \text{ 厘米})$$

$$\text{波数} = 15,384 \text{ 厘米}^{-1}$$

$$(c) \quad \lambda\nu = c \quad \nu = \frac{c}{\lambda}$$

$$\nu = \frac{3 \times 10^{10}}{6.50 \times 10^{-5}} \quad \nu = 4.61 \times 10^{14} \text{ 秒}^{-1}$$

分光光度计

分光光度计是一种用以测定给定波长下透过样品光量的仪器。分光光度计的基本部件(图 5-1)为: (a)光源, (b)传送高强度直线光的准直仪或聚焦仪器, (c)分解光线成其组成波长的单色光器(棱镜或光栅), (d)选择所需波长的装置, (e)样品室(样品置于试管或液槽中再放入室内), (f)光电探测器, 和(g)记录探测器输出的检流计。

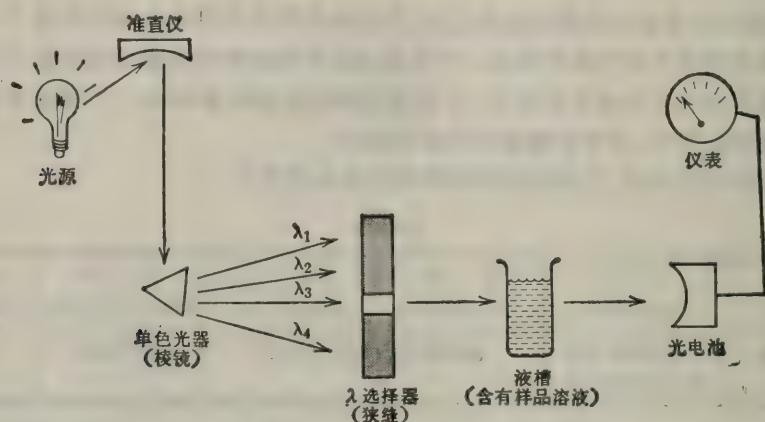


图 5-1 分光光度计的基本部件。

Lambert-Beer 定律

溶液吸收入射光的分数与样品溶液的厚度、溶液中吸光物质的浓度以及吸光物质的化学性质有关。光的吸收遵循指数规律而不是线性规律。某特殊物质所吸收的光与其浓度和光程厚度间的关系, 可用数学式表示如下:

$$-\frac{dI}{I} \propto c dl \quad \text{和} \quad -\frac{dI}{I} \propto l dc$$

或

$$\frac{dI}{I} = -kc dl \quad \text{和} \quad \frac{dI}{I} = -kl dc$$

式中, $-dI$ 是在恒定浓度时, 因光程厚度微小增量(dl)所导致的透射光的微小减量; 或在光程厚度不变时, 因浓度微小增量(dc)所导致的透射光的微小减量,

$$\frac{dI}{I} = \text{入射光被吸收的分数,}$$

k = 比例常数, 对所研究的特殊物质有具体的数值。

上述微分关系可在任两个厚度间(如 0 和 l 间)或在任两个浓度间(如 0 和 c 间)积分。

$$\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = -kc \int_0^l dl \quad \int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = -kl \int_0^c dc$$

$$\ln \frac{I}{I_0} = -kcl \quad \ln \frac{I}{I_0} = -klc$$

$$\ln \frac{I_0}{I} = kcl \quad \ln \frac{I_0}{I} = klc$$

或

$$\begin{aligned} 2.3 \log \frac{I_0}{I} &= kcl & 2.3 \log \frac{I_0}{I} &= klc \\ \log \frac{I_0}{I} &= \frac{k}{2.3} cl & \log \frac{I_0}{I} &= \frac{k}{2.3} lc \\ \log \frac{I_0}{I} &= acl & \log \frac{I_0}{I} &= alc \end{aligned} \quad (2)$$

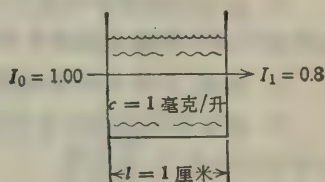
式中, a 为特殊吸光物质的“吸收指数”, 它又叫做“消光系数”或“吸收系数”。

如果浓度用摩尔浓度表示, a 即为“摩尔吸收系数”或“摩尔消光系数”, 用符号 a_m 或 E 表示。如果浓度用克/升做单位, a 变为“比吸收系数”, a_s ; $a_m = a_s \times MW$ 。如果浓度用 %w/v 表示, 则吸收系数用符号 $a_{1\%}$ 或 $E_{1\%}$ 表示。在大多数生化计算中, 常使用摩尔浓度和摩尔吸收系数。此外, 样品厚度通常总是 1 厘米。于是, a_m 的单位为 $M^{-1} \times \text{厘米}^{-1}$ 。吸收系数随变化的波长而改变。因此, 符号 a_{m340} 是指在 340 nm 处的摩尔吸收系数。 $\log I_0/I$ 项叫做“吸收率”用符号 A 表示, 或叫做“光密度”, 用符号 O.D. 表示。

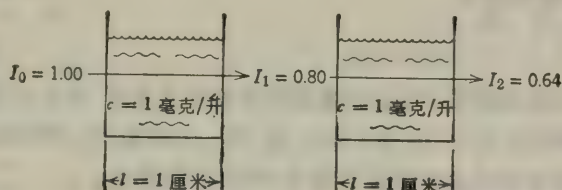
$$A = a_m cl \quad (3)$$

在给定波长下和 1 厘米的液槽中, 溶液浓度为 1 M 的某物质, 其吸收率在数值上与 a_m 相等。可以看出吸收率是浓度的线性函数。

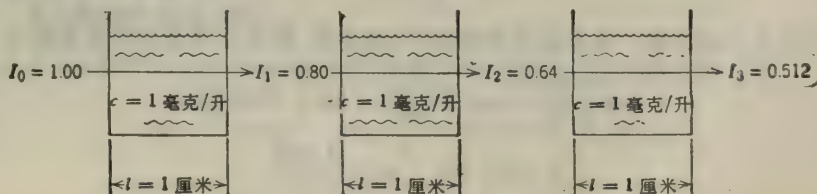
Lambert-Beer 定律的指数性质可叙述如下。设有一光线通过含有 1 毫克/升吸光化合物的 1 厘米液槽。假定有 80% 的入射光可透过 (20% 的入射光被吸收了)。



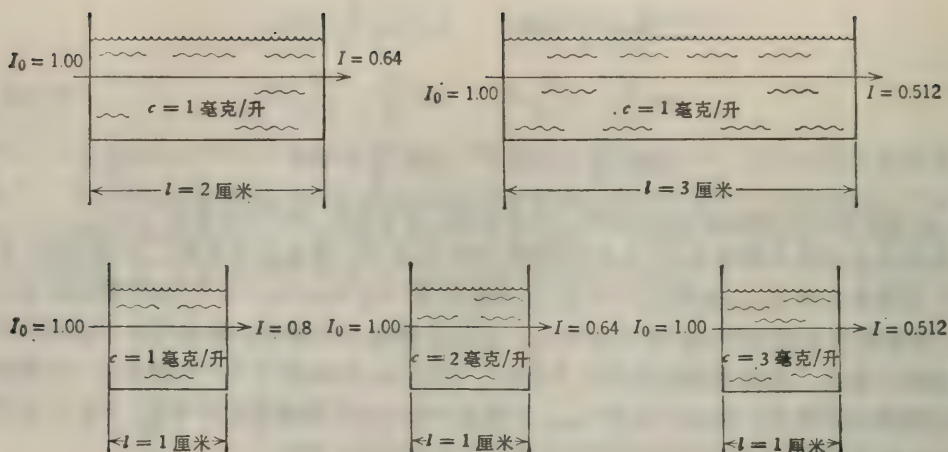
现在, 让我们将第二个同样大小的液槽直接放在穿过第一个液槽光线通道的后面。透射两个液槽后的光强度该怎样呢? 因为 Lambert-Beer 定律不是线性关系, 所以 I_2 不是 0.6。每厘米光程所吸收的光并非等量, 而是每厘米吸收了入射光的 20%。但第二个液槽的入射光是 I_1 , 或是 0.8。因此, 第二个液槽吸收的光是 0.8 的 20%, 即 0.16。透射过此液槽的光是 0.8 的 80%, 即原入射光的 64% 透射出来。



同理, 如果我们将三个 1 厘米的液槽排成一列, 每一液槽都吸收 20% 的入射光, 并透过 80% 的入射光, 其结果如下图:



如果我们改用 2 厘米厚和 3 厘米厚的单个液槽, 或者维持 l 不变而增加吸光化合物的浓度, 我们将会得到完全相同的结果。



一般原理

1. 如果某溶液的浓度为 c ，其透射光为 I (以小数表示之)，则当溶液的浓度为 $2c$ 时，透射光为 I^2 ，溶液的浓度为 $3c$ 时，透射光为 I^3 ，溶液的浓度为 nc 时，透射光为 I^n 。

2. 同理，如果光程厚度增加了 n 倍，则新的透射光变为 I^n 。

3. 溶液的吸光率是浓度的线形函数。 c 增加一倍，吸收率也增加一倍。 c 增加两倍，吸收率也增加两倍，余类推。

一般操作

所有光吸收的测定都应当是相对于空白溶液的测定。空白溶液中除了不含有被测化合物之外，含有化验中的所有成分。

只含有一种吸光化合物的溶液

例题 5-2

某溶液含有 2 克/升的吸光物质，它在 1 厘米的液槽中可透射 75% 一定波长的入射光。计算当溶液含有吸光物质为：(a) 4 克/升，(b) 1 克/升，(c) 6 克/升，和 (d) 5.4 克/升时，入射光的透射情况。(e) 如果被测化合物的分子量为 250，计算其 a_m 。

解：

$$(a) \quad \log \frac{I_0}{I} = ac l$$

首先求公式中的 a 值。由于浓度是用克/升表示的，所以 a 将是比吸收系数 a_s 。

$$\log \frac{1.00}{0.75} = (a_s) (2) (1) \quad \log 1.333 = 2a_s,$$

$$0.125 = 2a_s \quad a_s = \frac{0.125}{2}$$

$$a_s = 0.0625$$

既然我们已求出比吸收系数，在任何浓度下的 I 值就可以计算了。

$$\log \frac{I_0}{I} = a_s c l$$

I_0 用 100% 计算

$$\log \frac{100}{I} = (0.0625) (4) (1)$$

$$\log 100 - \log I = 0.25$$

$$\log 100 - 0.25 = \log I$$

$$2 - 0.25 = \log I$$

$$1.75 = \log I$$

$$I = 56.2\% \text{ 或 } 0.562$$

I_0 用 1.00 计算

$$\log \frac{1.00}{I} = (0.0625) (4) (1)$$

$$\log 1.00 - \log I = 0.25$$

$$\log I = -0.25$$

$$= -1 + 0.75$$

$$I = 5.62 \times 10^{-1}$$

$$I = 0.562$$

按照前面曾讲过的一般原理: 如果溶液的浓度为 c 时, 透射光为 I , 则当溶液的浓度为 nc 时透射光将为 I^n , 因此, 我们也能用之于求解本题。当 $c=2$ 时, $I=0.75$ 。∴ 当 $c=4$ (即, $2c_{\text{测}}$) 时, $I=0.75^2=0.562$ 。

(b)

公 式 法

$$\log \frac{I_0}{I} = a_s c l$$

$$\log \frac{100}{I} = (0.0625) (1) (1)$$

$$\log 100 - \log I = 0.0625$$

$$2 - \log I = 0.0625$$

$$2 - 0.0625 = \log I$$

$$1.9375 = \log I$$

$$I = 86.6\% \text{ 或 } 0.866$$

推 理 法

当 $c=2$ 时, $I=0.75$ 。∴ 当 $c=1$ (即,

$\frac{1}{2}c_{\text{测}}$) 时, $I=0.75^{1/2}$

$$I = \sqrt{0.75}$$

$$I = 0.866$$

(c)

公 式 法

$$\log \frac{I_0}{I} = a_s c l$$

$$\log \frac{100}{I} = (0.0625) (6) (1)$$

$$\log 100 - \log I = 0.375$$

$$2 - 0.375 = \log I$$

$$1.625 = \log I$$

$$I = 42.2\% \text{ 或 } 0.422$$

推 理 法

当 $c=2$ 时, $I=0.75$ 。∴ 当 $c=6$ (即, $3c_{\text{测}}$) 时, $I=0.75^3$

$$I = 0.422$$

(d) 由于 5.4 克/升不是 2 克/升的整数倍, 因此用公式法求解要比推理法简便。

$$\log \frac{100}{I} = a_s c l \quad \log \frac{100}{I} = (0.0625) (5.4) (1)$$

$$\log 100 - \log I = 0.3375 \text{ 或 } 2 - 0.3375 = \log I$$

$$1.6625 = \log I \quad I = \text{anti log } 1.6625 \quad I = 46.0\% \text{ 或 } 0.46$$

(e)

$$a_m = a_s \times MW = (0.0625) (250) \quad a_m = 15.63$$

例题 5-3

某溶液含有 $10^{-5} M$ ATP, 在 260nm 及 1 厘米液槽中的透射光为 0.702(70.2%). 计算(a) 此溶液在 3 厘米液槽中的透射光, (b) 此溶液在 1 厘米和 3 厘米液槽中的吸收率, (c) ATP 浓度为 $5 \times 10^{-5} M$ 的溶液, 在 1 厘米液槽中的吸收率和透射光.

解:

(a) 我们可以先计算出 a_m , 然后用公式法求透射光, 或用推理法求解.

公 式 法

$$\log \frac{I_0}{I} = a_m c l$$

$$\log \frac{100}{70.2} = (a_m) (10^{-5}) \quad (1)$$

$$\log 1.425 = 10^{-5} a_m$$

$$0.154 = 10^{-5} a_m$$

$$a_m = \frac{0.154}{10^{-5}} = 0.154 \times 10^5$$

$$a_m = 1.54 \times 10^4$$

$$\log \frac{I_0}{I} = a_m c l$$

$$\log \frac{100}{I} = (1.54 \times 10^4) (10^{-5}) \quad (3)$$

$$\log 100 - \log I = 4.62 \times 10^{-1}$$

$$2 - 0.462 = \log I$$

$$1.538 = \log I$$

$$I = 34.5\% \text{ 或 } 0.345$$

(b)

1 厘米液槽

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

$$A = \log \frac{100}{70.2} = \log 1.425$$

$$A = 0.154$$

或

$$A = a_m c l$$

$$A = (1.54 \times 10^4) (10^{-5}) \quad (1)$$

$$A = 0.154$$

推 理 法

当 $l=1$ 厘米时, $I=0.702$. \therefore 当 $l=3$ 厘米(即, $3l_{\text{cm}}$)时, $I=0.702^3$

$$I = 0.345$$

3 厘米液槽

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

$$A = \log \frac{100}{34.5} = \log 2.9$$

$$A = 0.462$$

或

$$A = a_m c l$$

$$A = (1.54 \times 10^4) (10^{-5}) \quad (3)$$

$$A = 0.462$$

或

$$A_{3\text{cm}} = 3 \times A_{1\text{cm}}$$

$$A_{3\text{cm}} = (3) (0.154)$$

$$A = 0.462$$

(c)

$$A_{5 \times 10^{-5} M} = 5 \times A_{1 \times 10^{-5} M}$$

$$A = (5)(0.154)$$

$$A = 0.77$$

$$\log \frac{I_0}{I} = A$$

$$\log 100 - \log I = 0.77$$

$$1.23 = \log I$$

$$I = 17.0\% \quad \text{或} \quad 0.17$$

或

$$A = a_m c l$$

$$A = (1.54 \times 10^4)(5 \times 10^{-5})(1)$$

$$A = 0.77$$

$$\log \frac{100}{I} = 0.77$$

$$2 - 0.77 = \log I$$

$$I = \text{anti log } 1.23$$

例题 5-4

糖原-碘复合物在 450 nm 处之比吸收系数 ($a_{1\%}^{1\text{cm}}$) 为 0.20。计算在 3 厘米液槽中, 吸收率为 0.38 的含碘复合物溶液中的糖原浓度。

解:

$$A = a_{1\%}^{1\text{cm}} c_{\%} l_{\text{cm}} \quad 0.38 = (0.20)(c_{\%})(3)$$

$$c_{\%} = \frac{0.38}{(0.2)(3)} = \frac{0.38}{0.6} \quad c = 0.633\%$$

例题 5-5

某细菌混悬液, 每升含 400 毫克干菌体, 在 450 nm 及 1 厘米液槽中的吸收率为 1.00。若混悬液在 3 厘米液槽中的透射光为 30%, 问此混悬液中细胞的密度是多少?

解:

首先计算在 1 厘米液槽中混悬液的吸收率。

$$A_{3\text{cm}} = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{100}{30} = \log 3.333 = 0.523$$

$$A_{1\text{cm}} = \frac{A_{3\text{cm}}}{3} = \frac{0.523}{3} = 0.1743$$

因为我们知道: A 为 1.00 相当于 400 毫克/升的细菌细胞, 所以 A 为 0.174 时所相当的密度可用简单的比例求出:

$$\frac{1.00 A \text{ 单位}}{400 \text{ 毫克/升}} = \frac{0.1743 A \text{ 单位}}{X \text{ 毫克/升}}$$

$$X = 69.7 \text{ 毫克/升}$$

另一个解法是为该细菌定义一个比吸收系数。

如果 A 为 1.00 \simeq 400 毫克/升细菌, 则 1 克/升细菌的 A 值可以计算。

$$\frac{1.00 A \text{ 单位}}{0.40 \text{ 克/升细菌}} = \frac{a_s}{1.0 \text{ 克/升细菌}}$$

$$a_s = 2.5$$

现在使用通用公式

$$A = (a_s)(c_{\text{克/升}})(l_{\text{cm}}) \quad 0.523 = (2.5)(c_{\text{克/升}})(3)$$

$$c_{\text{克/升}} = \frac{0.523}{7.5} = 0.0697 \text{ 克/升}$$

$$c = 69.7 \text{ 毫克/升}$$

蛋白质的测定

测定溶液中的蛋白质有数种分光光度方法。二缩脲法是基于在碱性溶液中 Cu^{2+} 与肽反应产生在 540 nm 处有最大吸收的紫色复合物而设立的。二缩脲法适用于含有 0.5—10 毫克蛋白质/毫升的溶液。对于干扰物质，如硫醇类、 NH_4^+ 以及诸如此类物质的去除，可通过加入等体积 10% 的冻三氯乙酸沉淀蛋白质，弃去上清液，然后再将蛋白质重新溶解在已知体积的 1 N NaOH 溶液中。

Lowry 法所产生的颜色来自二缩脲反应和酪氨酸残基对磷钼酸-磷钨酸试剂 (Folin-Ciocalteu 酚试剂) 的还原。Lowry 法适用于含有 20—40 微克蛋白质/毫升的溶液。

多数蛋白质在 280 nm 处有清晰的最大吸收。这主要是由于含有酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸的缘故。如果不存在干扰物质，可利用 280 nm 处的吸收率测定蛋白质含量为 0.1—0.5 毫克/毫升的溶液。部分提纯的蛋白质制剂可能含有在 260 nm 处有最大吸收的核酸类物质。在有核酸类物质存在时，蛋白质的浓度可用下式计算：

$$[\text{蛋白质}]_{\text{毫克/毫升}} = 1.55A_{280}^{1\text{cm}} - 0.76A_{260}^{1\text{cm}} \quad (4)$$

这个公式是为烯醇化酶 ($A_{280}/A_{260} = 1.75$) 在有酵母核酸 ($A_{280}/A_{260} = 0.49$) 存在情况下导出的，因而用于其它蛋白质或其它核酸类物质可能不够准确。不同蛋白质的 $a_{280}^{0.1\%}$ 值在 0.5—2.5 的范围间变动 (与芳香氨基酸的含量有关)。

所有的蛋白质在低于 230 nm 时都有很强的吸光作用。例如，牛血清清蛋白的 $a_{230}^{0.1\%}$ 值在 225 nm 时为 5.0，在 215 nm 时为 11.7 (与在 280 nm 时为 0.58 相比较)。低于 230 nm 的吸收是由于肽键所引起。因此，所有蛋白质的 $a_{230}^{0.1\%}$ 值基本上相同。蛋白质浓度在 10—100 微克/毫升范围间可用 215 nm 和 225 nm 吸收率之差来确定。标准曲线的制作是以 $4A$ 对 [蛋白质] 作图。作为蛋白质浓度的近似表示式可以写成：

$$[\text{蛋白质}]_{\text{微克/毫升}} = 144(A_{215\text{nm}}^{1\text{cm}} - A_{225\text{nm}}^{1\text{cm}}) \quad (5)$$

吸收率之差经常用来减少溶液中由非蛋白质化合物所引起的误差。某些缓冲液成分，在高浓度时有干扰作用。有些无机化合物也可能有干扰作用 (例如，不能用 0.1 N NaOH 溶解蛋白质，但是用 5 mM NaOH 溶解蛋白质则不致有问题)。

例题 5-6

某蛋白质溶液 (0.3 毫升) 用 0.9 毫升水稀释。向 0.5 毫升的这个稀溶液中加入 4.5 毫升二缩脲试剂，并使之显色。此混合物在 540 nm 处和直径 1 厘米试管中的吸收率为 0.18。标准溶液 (0.5 毫升，每毫升含 4 毫克蛋白质) 加入 4.5 毫升二缩脲试剂，在同样大小试管中的吸收率为 0.12。计算未经稀释的未知溶液中蛋白质的浓度。

解：

根据标准反应混合物的吸收率，我们可求出比吸收系数。

$$A = a_{\text{毫克/毫升}} \times c_{\text{毫克/毫升}} \times l_{\text{厘米}}$$

但是，由于标准溶液和未知溶液的光程厚度相同，故可以略去公式中的 l 项 (在某种意义上，相当于我们将 l 项并入到比吸收系数中)。同样地，由于两种反应混合物的总体积都是 5 毫升，所以我们可以用蛋白质的重量代替浓度。

$$A = a_{\text{毫克}} \times wt_{\text{毫克}} \quad 0.12 = a_{\text{毫克}} \times 2 \text{毫克}$$

$$a_{1\text{毫克}} = \frac{0.12}{2} \quad a_{1\text{毫克}} = 0.06$$

这就是说, 1 毫克蛋白质(在 0.5 毫升标准样品中)加入 4.5 毫升二缩脲试剂, 在 540 nm 处和特定的试管中, 得出的吸收率为 0.06.

在 0.5 毫升稀释的未知物中蛋白质的重量现在就可以计算了.

$$A = a_{1\text{毫克}} \times wt_{\text{毫克}} \quad wt_{\text{毫克}} = \frac{A}{a_{1\text{毫克}}} = \frac{0.18}{0.06}$$

$$wt_{\text{毫克}} = 3 \text{ 毫克}$$

由于反应混合物的吸收率与蛋白质的含量成正比, 因此我们也可以用简单的比例关系求出未知物的重量.

$$\frac{A_s}{wt_s} = \frac{A_u}{wt_u} \quad \frac{0.12}{2 \text{ 毫克}} = \frac{0.18}{wt_u}$$

$$wt_u = \frac{0.18}{0.12} \times 2 = 1.5 \times 2$$

$$wt_u = 3 \text{ 毫克}$$

式中, A_s = 标准溶液的 A 值,

A_u = 未知溶液的 A 值,

wt_s = 标准样品中蛋白质的重量,

wt_u = 未知样品中蛋白质的重量.

在 0.5 毫升稀释的未知样品中有 3 毫克蛋白质, 因之, 稀释的未知样品中蛋白质的浓度为

$$\frac{3 \text{ 毫克}}{0.5 \text{ 毫升}} = 6 \text{ 毫克/毫升}$$

被分析的样品是原始未知溶液的 4 倍稀释液. 原始溶液中蛋白质的浓度可根据稀释因数计算.

$$c_{\text{原}} = c_{\text{稀}} \times \text{稀释因数} = 6 \text{ 毫克/毫升} \times 4$$

$$c_{\text{原}} = 24 \text{ 毫克/毫升}$$

注意, 0.9 毫升水加到 0.3 毫升原始溶液中, 总体积增到 1.2 毫升——稀释倍数是四倍而不是三倍.

例题 5-7

根据下表数据估计: (a) 未稀释溶液的蛋白质浓度, 和 (b) 稀释溶液的蛋白质浓度. 测定时, 使用 1 厘米液槽.

溶 液	$A_{280 \text{ nm}}$	$A_{260 \text{ nm}}$	$A_{235 \text{ nm}}$	$A_{215 \text{ nm}}$
未稀释溶液	0.35	0.20	—	—
1:10 稀释溶液	—	—	0.20	0.47

解:

$$(a) \quad [\text{蛋白质}]_{\text{毫克/毫升}} = 1.55A_{280} - 0.76A_{260} = (1.55)(0.35) - (0.76)(0.20)$$

$$= 0.5425 - 0.1520$$

$$[\text{蛋白质}] = 0.391 \text{ 毫克/毫升}$$

$$(b) \quad [\text{蛋白质}]_{\text{微克/毫升}} = 144(A_{215} - A_{225}) = 144(0.47 - 0.20) = 144(0.27)$$

$$[\text{蛋白质}] = 38.9 \text{ 微克/毫升}$$

未稀释溶液*含有的蛋白质为 $(38.9)(10) = 389 \text{ 微克/毫升} = 0.389 \text{ 毫克/毫升}$ 。因此,这两种方法得到基本一致的结果。

例题 5-8

某含有钼的纯酶,在1厘米液槽中的 $a_{280\text{ nm}}^{0.1\%}$ 值为0.15。该蛋白质的浓溶液含10.56微克 Mo/毫升。同一溶液的1:50稀释液,其 $A_{280\text{ nm}}$ 值为0.375。计算这个酶的最低分子量。Mo的原子量为95.94。

解:

浓溶液含有

$$\frac{10.56 \times 10^{-6} \text{ 克 Mo/毫升}}{95.94 \text{ 克/克原子 Mo}} = 1.1 \times 10^{-7} \text{ 克原子 Mo/毫升}$$

$a^{0.1\%}$ 是溶液含有1毫克蛋白质/毫升的吸收率。浓溶液的吸收率为

$$(50)(0.375) = 18.75$$

$$A = (a^{0.1\%})(c_{\text{毫克/毫升}})(l) \quad \text{或} \quad c_{\text{毫克/毫升}} = \frac{A}{(a^{0.1\%})(l)}$$

$$\therefore c = \frac{18.75}{1.5} = 12.5 \text{ 毫克/毫升} = 12.5 \times 10^{-3} \text{ 克/毫升}$$

最低分子量乃是含有一克原子 Mo 的酶重量。

$$\frac{12.5 \times 10^{-3} \text{ 克蛋白质}}{10.56 \times 10^{-6} \text{ 克原子 Mo}} = \frac{\text{MW}}{95.94 \text{ 克 Mo}}$$

或

$$\frac{12.5 \times 10^{-3} \text{ 克蛋白质}}{1.110^{-7} \text{ 克原子 Mo}} = \frac{\text{MW}}{1 \text{ 克原子}}$$

$$\text{MW} \approx 113,600$$

含有两种吸光化合物的溶液

例题 5-9

某含有 NAD^+ 和 NADH 的溶液,在1厘米液槽和340nm处的光密度为0.311,在260nm处的光密度为1.2。计算该溶液中氧化态辅酶和还原态辅酶的浓度。 NAD^+ 和 NADH 两者在260nm处都吸光,但只是 NADH 在340nm处吸光。这两种物质的消光系数给出如下:

化 合 物 A	$a_m (M^{-1} \times \text{厘米}^{-1})$	
	260 nm	340 nm
NAD^+	18,000	~ 0
NADH	15,000	6220

解:

每一种形态辅酶的浓度可计算如下。首先从340nm处的吸收率计算 NADH 的浓度。在

* 原文为 diluted solution (稀释溶液),可能是 undiluted (未稀释溶液) 之误——译者注。

此波长下, NAD^+ 不吸光.

$$A = (a_m)(c)(l)$$

$$0.311 = (6.22 \times 10^3)(c)(1)$$

$$c = \frac{3.11 \times 10^{-1}}{6.22 \times 10^3} = 0.5 \times 10^{-4}$$

$$c_{\text{NADH}} = 5 \times 10^{-5} M$$

其次, 计算 260 nm 处来自 NADH 之吸收率.

$$A = (a_m)(c)(l)$$

$$A = (15.0 \times 10^3)(5 \times 10^{-5})(1) = 75 \times 10^{-2}$$

$$A_{260[\text{NADH}]} = 0.75$$

在 260 nm 处剩余的吸收率必定来自 NAD^+ .

$$\begin{array}{r} 260 \text{ nm 处的总 } A \text{ 值为 } 1.20 \\ - 260 \text{ nm 处 NADH 的 } A \text{ 值为 } 0.75 \\ \hline 260 \text{ nm 处 } \text{NAD}^+ \text{ 的 } A \text{ 值为 } 0.45 \end{array}$$

最后, 根据 NAD^+ 在 260 nm 处的吸收率, 计算 NAD^+ 的浓度.

$$A = (a_m)(c)(l) \quad 0.45 = (18.0 \times 10^3)(c)(1)$$

$$c = \frac{4.5 \times 10^{-1}}{18.0 \times 10^3} = 0.250 \times 10^{-4}$$

$$c_{\text{NAD}^+} = 2.50 \times 10^{-5} M$$

例题 5-10

皂化 10 克黄油后, 将未皂化部分抽提到 25 毫升氯仿中. 氯仿液在 1 厘米液槽和 328 nm 处的吸收率为 0.53, 在 458 nm 处的吸收率为 0.48. 计算黄油中胡萝卜素和维生素 A 的含量. 胡萝卜素和维生素 A 在上述二波长下的消光系数如下:

化 合 物	在 CHCl_3 中的 $a_{1\%}^{1\text{cm}}$ 值	
	328 nm	458 nm
胡萝卜素	340	2200
维生素 A	1550	~0

解:

胡萝卜素的浓度可自 458 nm 处的吸收率求得. 在此波长下维生素 A 不吸光.

$$A = (a_{1\%})(c_{\text{克/100毫升}})(l) \quad 0.48 = (2200)(c)(1)$$

$$c = \frac{0.48}{2200} = \frac{4.8 \times 10^{-1}}{2.2 \times 10^3}$$

$$c_{\text{胡萝卜素}} = 2.18 \times 10^{-4} \text{ 克/100 毫升}$$

氯仿抽提液(25 毫升)中胡萝卜素的总量为

$$\frac{2.18 \times 10^{-4} \text{ 克/100 毫升}}{4} = 0.545 \times 10^{-4} \text{ 克} = 0.0545 \text{ 毫克}$$

黄油中胡萝卜素的含量为

$$\frac{0.0545 \text{ 毫克}}{10 \text{ 克}} = 5.45 \times 10^{-3} \text{ 毫克胡萝卜素/克黄油}$$

或

$$5.45 \text{ 微克胡萝卜素/克黄油}$$

黄油中的维生素 A 含量, 可用 328 nm 处氯仿溶液的吸收率, 经校正胡萝卜素吸收率后计算。

$$A_{328 \text{ nm}} = (a_{1\%}) (c_{\text{克/100 毫升}}) (l) = (340) (2.18 \times 10^{-4}) (1) = 741 \times 10^{-4}$$

$$A_{320 \text{ nm}} = 0.0741$$

$$\begin{array}{r} 328 \text{ nm 处总的 } A \text{ 值为 } 0.530 \\ - 328 \text{ nm 处胡萝卜素的 } A \text{ 值为 } 0.074 \\ \hline 328 \text{ nm 处维生素 A 的 } A \text{ 值为 } 0.456 \end{array}$$

$$A_{\text{维 A}} = (a_{1\%}) (c_{\text{克/100 毫升}}) (l) \quad 0.456 = (1550) (c) (1)$$

$$c = \frac{0.456}{1550} = \frac{45.6 \times 10^{-2}}{15.5 \times 10^2}$$

$$c_{\text{维 A}} = 2.94 \times 10^{-4} \text{ 克/100 毫升}$$

氯仿抽提液中维生素 A 含量为

$$\frac{2.94 \times 10^{-4} \text{ 克/100 毫升}}{4} = 0.735 \times 10^{-4} \text{ 克} = 0.0735 \text{ 毫克}$$

黄油中维生素 A 含量为

$$\frac{73.5 \text{ 微克}}{10 \text{ 克}} = 7.35 \text{ 微克维生素 A/克黄油}$$

例题 5-11

含有 A 和 B 两种物质的某溶液, 在 1 厘米液槽和 350 nm 处的吸收率为 0.36, 在 400 nm 处的吸收率为 0.225。A 和 B 这两种物质在两个波长下的摩尔吸收系数如下。计算溶液中 A 和 B 的浓度。

化 合 物	$a_m (M^{-1} \times \text{厘米}^{-1})$	
	350 nm	400 nm
A	15,000	3,000
B	7,000	6,500

解:

由于在两个波长下这两种物质均吸光, 我们能建立两个联立方程式:

$$A_{350 \text{ nm}} = (a_{m350[A]} \times c_A) + (a_{m350[B]} \times c_B)$$

$$0.36 = (15 \times 10^3 c_A) + (7 \times 10^3 c_B)$$

$$A_{400 \text{ nm}} = (a_{m400[A]} \times c_A) + (a_{m400[B]} \times c_B)$$

$$0.225 = (3 \times 10^3 c_A) + (6.5 \times 10^3 c_B)$$

其次, 将 c_A 化为 c_B 的函数, 或 c_B 化为 c_A 的函数。

$$0.36 = 15 \times 10^3 c_A + 7 \times 10^3 c_B$$

$$0.36 - 7 \times 10^3 c_B = 15 \times 10^3 c_A$$

$$c_A = \frac{0.36 - 7 \times 10^3 c_B}{15 \times 10^3}$$

然后,将上面的 c_A 值代到 A 的第二个表达式中.

$$0.225 = (3 \times 10^3 c_A) + (6.5 \times 10^3 c_B)$$

$$0.225 = (3 \times 10^3) \frac{0.36 - 7 \times 10^3 c_B}{15 \times 10^3} + 6.5 \times 10^3 c_B$$

$$0.225 = \frac{1.08 \times 10^3 - 21 \times 10^6 c_B}{15 \times 10^3} + \frac{6.5 \times 10^3 c_B}{1}$$

将等号右侧第二项的分子和分母都乘以 15×10^3 , 并且合并同类项:

$$0.225 = \frac{1.08 \times 10^3 - 21 \times 10^6 c_B}{15 \times 10^3} + \frac{(15 \times 10^3)(6.5 \times 10^3 c_B)}{15 \times 10^3}$$

$$0.225 = \frac{1.08 \times 10^3 - 21 \times 10^6 c_B + 97.5 \times 10^6 c_B}{15 \times 10^3}$$

$$3.38 \times 10^3 = 1.08 \times 10^3 - 21 \times 10^6 c_B + 97.5 \times 10^6 c_B$$

$$2.30 \times 10^3 = 76.5 \times 10^6 c_B$$

$$c_B = \frac{2.3 \times 10^3}{76.5 \times 10^6} = \frac{23 \times 10^3}{7.65 \times 10^7}$$

$$c_B = 3 \times 10^{-5} M$$

既然知道了 c_B , 将 c_B 值代入 $A_{350 \text{ nm}}$ 或 $A_{400 \text{ nm}}$ 的表达式中, 即可计算出 c_A .

$$0.36 = (15 \times 10^3 c_A) + (7 \times 10^3 c_B)$$

$$0.36 = 15 \times 10^3 c_A + (7 \times 10^3)(3 \times 10^{-5})$$

$$0.36 = 15 \times 10^3 c_A + 0.21 \quad 0.15 = 15 \times 10^3 c_A$$

$$c_A = \frac{0.15}{15 \times 10^3} = \frac{15 \times 10^{-3}}{15 \times 10^{-3}} \quad c_A = 1 \times 10^{-5} M$$

偶联测定法

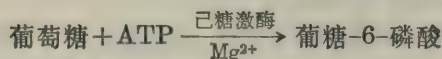
许多具有生物学重要意义的化合物并不具有明显的最大吸收. 但是, 如果它们能够化学计量地促进另一种具有特征吸收峰的化合物形成, 就可以测定它们的浓度.

例题 5-12

向 2.0 毫升葡萄糖溶液中加入 1.0 毫升含有过量 ATP, NADP^+ , MgCl_2 , 己糖激酶, 和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的溶液. 此最终溶液在 340 nm 处的吸收率(在 1 厘米液槽中)增高到 0.91. 计算原始溶液中葡萄糖的浓度.

解:

所发生的反应如下:



虽然葡萄糖在 340 nm 处不吸光, 但 NADPH 则吸光. 由于己糖激酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶所催化的反应, 其 $K_{\text{平}}$ 值极端偏向右方, 而且由于有过量的 ATP 和 NADP^+ 存在, 所以每有 1 摩尔的葡萄糖就可以产生 1 摩尔的 NADPH. 根据 340 nm 处的吸收率, 我们可

计算出所存在的 NADPH 的浓度。再经过稀释倍数的校正，我们能计算出在原始溶液中葡萄糖的浓度。

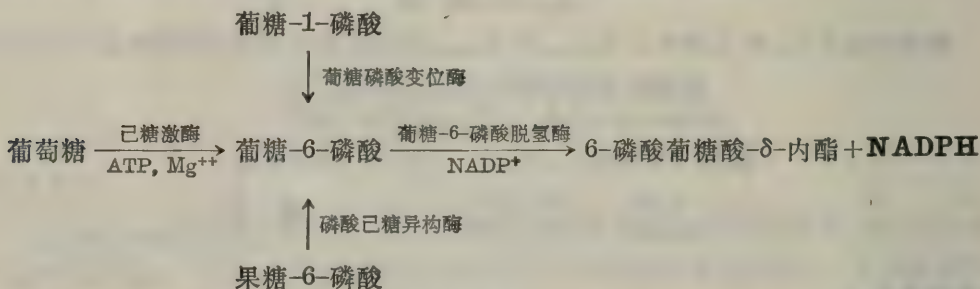
$$\begin{aligned}
 A &= a_m c l \\
 0.91 &= (6.22 \times 10^3) (c) (1) \\
 c_{\text{NADPH}} &= \frac{0.91}{6.22 \times 10^3} = \frac{9.1 \times 10^{-1}}{6.22 \times 10^3} \\
 c_{\text{NADPH}} &= 1.463 \times 10^{-4} \text{ M NADPH} \\
 c_{\text{葡萄糖}} &= (1.463 \times 10^{-4}) \times \text{稀释因数} = (1.463 \times 10^{-4}) \frac{3}{2} \\
 c_{\text{葡萄糖}} &= 2.2 \times 10^{-4} \text{ M}
 \end{aligned}$$

例题 5-13

根据在 340 nm 处的光吸收，试描述一测定方法，据此，使之用于测定混合物中葡萄糖、葡萄糖-6-磷酸、葡萄糖-1-磷酸和果糖-6-磷酸的浓度。

解：

所有的四种化合物都可以通过下面所示的反应产生化学计量的 NADPH。



(a) 首先加入葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和极大过量的 NADP^+ 和 MgCl_2 。这时，葡萄糖-6-磷酸转化成 6-磷酸葡萄糖酸- δ -内酯，并有化学计量的 NADPH 出现。测量它在 340 nm 处的吸收率。

(b) 当 A 值不再继续增长时，加入葡萄糖磷酸变位酶。这个酶催化葡萄糖-1-磷酸转变成葡萄糖-6-磷酸，产生了较多的、相当于原有葡萄糖-1-磷酸含量的 NADPH。测定 $A_{340 \text{ nm}}$ 处的增加值。

(c) 当吸收率不再继续增长时，加入磷酸己糖异构酶。这个酶催化果糖-6-磷酸转变成葡萄糖-6-磷酸，使 NADPH 又一次增加。测定 $A_{340 \text{ nm}}$ 处的增加值。

(d) 最后，加入己糖激酶和 ATP。同前面所描述的一样，存有的葡萄糖产生出化学计量的 NADPH。再次测定 $A_{340 \text{ nm}}$ 处的增加值。

虽然葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡萄糖磷酸变位酶，和磷酸己糖异构酶所催化的反应不具有大的 $K_{\text{平}}$ 值，但由于使用极大过量的 NADP^+ ，总的转化成 6-磷酸葡萄糖酸- δ -内酯和 NADPH 的反应能被较多的推向右方。此外，如果任何一个酶沾污有 6-磷酸葡萄糖酸内酯酶，总的反应顺序就成为不可逆的了。图 5-2 表示，在测定过程中 $A_{340 \text{ nm}}$ 值随时间的变化情况。

用任一处的 $\Delta A_{340 \text{ nm}}$ 值计算 ΔNADPH 的浓度时，对原有 NADPH 的稀释须做校正。同样，在从 ΔNADPH 值计算原始溶液中葡萄糖、葡萄糖-6-磷酸等物质的浓度时，必须把测定

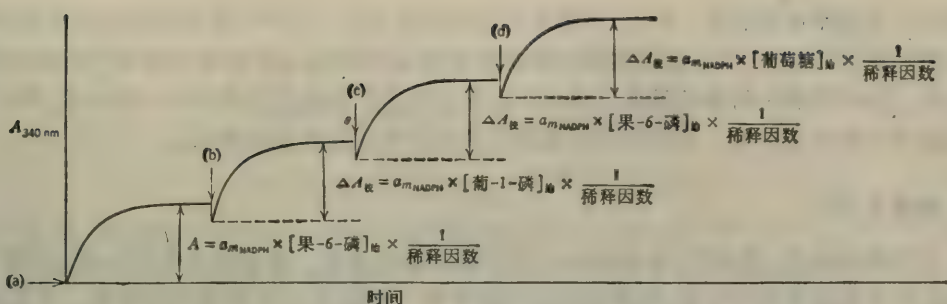


图 5-2 在与 NADPH 有联系的葡萄糖及其衍生物的测定过程中, 吸收率的变化。

混合物的总稀释情况考虑进去。

如果所加入酶的体积同总化验体积相比是很小的话, 则稀释情况可以不计。例如, 化验体积可能是 1.0 或 3.0 毫升(常用的液槽大小), 而加入酶的体积可能是 10 微升, 于是可略去不计。

例题 5-14

向 1.0 毫升葡萄糖-6-磷酸和葡萄糖-1-磷酸的混合溶液中加入 1.0 毫升含有过量的 NADP^+ 、 MgCl_2 和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的溶液。此溶液在 1 厘米液槽, 340nm 处的吸收率增加到 0.57。当所观察的吸收率不再继续增加时, 再加入 1.0 毫升葡萄糖磷酸变位酶溶液, 吸收率随即降到 0.50。计算(a)原始溶液中葡萄糖-6-磷酸的浓度和(b)原始溶液中葡萄糖-1-磷酸的浓度。

解:

$$(a) \quad A = a_m \times c_{\text{NADPH}} \times l \quad 0.57 = (6.22 \times 10^3) (c_{\text{NADPH}}) (1)$$

$$c_{\text{NADPH}} = \frac{0.57}{6.22 \times 10^3} = \frac{57 \times 10^{-2}}{6.22 \times 10^3} = 9.16 \times 10^{-5} M$$

$$c_{\text{葡-6-磷酸}} = (9.16 \times 10^{-5}) \times \text{稀释因数} = (9.16 \times 10^{-5}) (2)$$

$$c_{\text{葡-6-磷酸}} = 1.83 \times 10^{-4} M$$

(b)

$$\Delta A_{\text{被}} = A_{\text{终}} - A_{\text{始, 被}}$$

$$A_{\text{始, 被}} = (0.57) \frac{2}{3} = 0.38$$

$$\Delta A_{\text{被}} = 0.50 - 0.38 = 0.12$$

$$\Delta A = a_m \times \Delta c_{\text{NADPH}} \times l$$

$$0.12 = (6.22 \times 10^3) \times (\Delta c_{\text{NADPH}}) \times (1)$$

$$\Delta c_{\text{NADPH}} = \frac{0.12}{6.22 \times 10^3} = \frac{12 \times 10^{-2}}{6.22 \times 10^3}$$

$$\Delta c_{\text{NADPH}} = 1.93 \times 10^{-5} M$$

$$c_{\text{葡-1-磷酸}} = 1.93 \times 10^{-5} \times \text{稀释因数} = (1.93 \times 10^{-5}) (3)$$

$$c_{\text{葡-1-磷酸}} = 5.79 \times 10^{-5} M$$

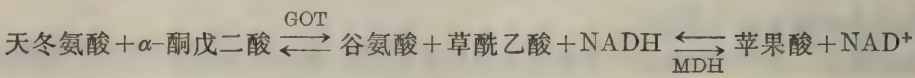
酶的测定

酶的测定可根据产物出现的速度或底物消失的速度用分光光度法进行。如果底物或产

物都不具有明晰的吸收峰，那么，可将所考虑的反应与另一个产生吸光产物的反应相偶联。在这种偶联测定法中，所有辅助性酶类都必须过量，以便使总反应速度仅取决于所测定的酶的活性。如果所测定的酶的最适条件和产生最后吸光产物的最适条件不一致的话，那么，总测定法可分做两步进行。下面的例题将说明连续的和分成两步的测定法。

例题 5-15

患了心肌梗塞症后，就有谷-草转氨酶(GOT)释放进入血流。此酶在血清中的测定方法，是根据在苹果酸脱氢酶(MDH)所偶联的反应程序中，跟踪 NADH 吸收率的降低，其反应如下：



反应混合物中含有过量的天冬氨酸(即，比它的 K_m 值要大 100 倍)，0.1 毫升血清、0.3 微摩尔 NADH 和过量的苹果酸脱氢酶，总体积为 0.9 毫升。加入含有过量 α -酮戊二酸的溶液 0.1 毫升使反应开始。经过短暂的迟延，吸收率以 0.04A 单位/分的速度降低。液槽的光程为 1 厘米。计算患者血清中 GOT 的浓度(即血清的比活性，用酶单位/毫升来表示)。

解：

$$v = \Delta A / \text{分} = 0.04 / \text{分}$$

$$\Delta A = (a_m)(\Delta c)(l) \quad \text{或} \quad \Delta c = \frac{\Delta A}{(a_m)(l)}$$

$$\Delta c = \frac{(0.04)}{(6.22 \times 10^3)(1)} = 6.43 \times 10^{-6} M = 6.43 \text{ 微摩尔/升}$$

$$v = 6.43 \text{ 微摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1} = 6.43 \times 10^{-3} \text{ 微摩尔} \times \text{毫升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$$

因之，1.0 毫升液槽中含有 6.43×10^{-3} 单位的酶活性。这个活性来自 0.1 毫升血清。所以，血清中含有

$$\frac{6.43 \times 10^{-3} \text{ 单位}}{0.1 \text{ 毫升}} = 6.43 \times 10^{-2} \text{ 单位/毫升}$$

例题 5-16

我们要测定青霉属(*Penicillium chrysogenum*)菌无细胞提取液的 β -半乳糖苷酶活性。将此提取液(2.5 毫升)与 $3 \times 10^{-3} M$ 对-硝基苯酚- β -半乳糖苷及缓冲液一起保温，总体积为 1.0 毫升。定时取样 0.1 毫升，加到 2.9 毫升 0.1 N NaOH 中。确定自由的对-硝基苯酚浓度是以对-硝基苯酚- β -半乳糖苷 + 缓冲液 + NaOH 为空白，测定其在 400nm 处的吸收率(对-硝基苯酚在 0.1 N NaOH 中的 a_m 值为 18,300)。该无细胞提取液含有 5 毫克蛋白质/毫升。在 1 厘米液槽中 NaOH 液的吸收率如下：

保 温 时 间 (分)	$A_{400 \text{ nm}}$
2	0.09
4	0.18
6	0.27

计算此无细胞提取液中 β -半乳糖苷酶的比活性。

解:

$$v = \Delta A / \text{分} = 0.045 / \text{分}$$

$$\Delta A = (a_m)(\Delta c)(l) \quad \text{或} \quad \Delta c = \frac{\Delta A}{(a_m)(l)}$$

$$\Delta c = \frac{0.045}{(18.3 \times 10^3)(1)} = 2.46 \times 10^{-6} M$$

因之, 在 NaOH 溶液中对-硝基苯酚的浓度增加速度为 $2.46 \times 10^{-6} M/\text{分} = 2.46 \times 10^{-3}$ 微摩尔 \times 毫升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$ 。NaOH 溶液的体积为 3.0 毫升。所以每分钟对-硝基苯酚的生成量 = $(3)(2.46 \times 10^{-3}) = 7.38 \times 10^{-3}$ 微摩尔。该 7.38×10^{-3} 微摩尔是 0.1 毫升测定混合物每分钟的生成量。在测定混合物中:

$$v = 7.38 \times 10^{-2} \text{ 微摩尔} \times \text{毫升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$$

1.0 毫升测定混合物中含有 0.25 毫升无细胞提取液。因此, 在这个测定混合物中蛋白质的浓度为

$$(0.25 \text{ 毫升/毫升})(5 \text{ 毫克蛋白质/毫升}) = 1.25 \text{ 毫克/毫升}$$

$$\therefore S. A. = \frac{7.38 \times 10^{-2}}{1.25} = 0.059 \text{ 单位/毫克蛋白质}$$

可以看到, 6 分钟用掉了 $(7.38 \times 10^{-2})(6) = 0.4428$ 微摩尔的底物。此数值代表 14.8% 的原始底物浓度。产物仍与时间呈现线形关系的事实, 说明了 $[S]$ 依然是 $\gg K_m$, 而且

$$v = V_{\text{最大}}$$

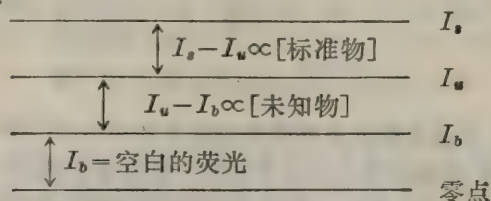
B. 荧光法

许多化合物吸收光后, 随即将一些能量以较长波长的光重新放出。这种荧光现象可同一种叫做荧光计的仪器配合, 用以测定浓度很低的某些化合物。荧光计不同于分光光度计之处在于: (a) 需在入射光呈 90° 的地方观测发射的荧光。 (b) 需要两个波长选择器——一个用以透过所需要的激发 λ , 另一个则用以选择所需要的发射 λ 。通常用滤光片(单一滤光片或组合滤光片)选择所需之波长。

荧光法有极高的选择性, 因为只有一定波长的光才能激发一定的化合物。同样地, 荧光只能在一定的波长处产生。换句话说, 荧光化合物具有特征的激发光谱和特征的荧光光谱。凡激发光谱和(或)荧光光谱有足够差别的两种化合物, 可在彼此存在时予以测定, 这与前面所介绍的光谱光度法大体相似。本身无荧光的化合物常可用化学方法或酶学方法使之转化成另一种具有荧光的化合物。

荧光化合物在低浓度时, 其荧光强度与浓度成正比。因此, 荧光强度与分光光度法中的吸收率相似(线形参量), 而不同于透射光(对数参量)。某物质发射的荧光可被样品中其他物质吸收或猝灭。正是由于这个原因, 所以在每次测定时需要有内(“回收”)标准物。例如, 25 微克纯化合物 X 由其本身产生的荧光强度为 53 个任意单位。然后, 如果将 25 微克的纯化合物 X 加到样品中(此样品可能是稀释的尿或血清, 或是含有有机缓冲液的酶测定混合物), 我们观察到的荧光值只比样品本身的荧光值增加了 29 个单位。显然, 在测定条件下只观察到内标准物荧光的 $29/53 = 54.7\%$ 。因此, 在该测定条件下, 25 微克的 X 只相当于 29 单位的荧光物质(而不是 53 单位)。从读数中减去空白的荧光值也是需要的。空白中应

当含有与样品相同的各种物质。例如,如果样品是用化学方法处理产生荧光的,则空白就应当含有同样的各种化学试剂,尽管加入的顺序并不使被测定的物质转化成荧光产物。各种读数可以图解说明如下:



在此, I_b = 空白的荧光,

I_u = 未知物加空白的荧光,

I_s = 内标准物加未知物加空白的荧光。

∴ $I_u - I_b$ = 在测定条件下未知物的荧光

$I_s - I_u$ = 在测定条件下标准物的荧光

而且

$$\frac{\text{未知物的荧光}}{\text{标准物的荧光}} = \frac{\text{未知物含量}}{\text{标准物含量}}$$

或

$$\frac{I_u - I_b}{I_s - I_u} = \frac{\text{未知物含量}}{\text{标准物含量}} \quad (6)$$

例题 5-17

儿茶酚胺类(肾上腺素和正肾上腺素)经过氧化和用碱处理可转化成荧光化合物(叫做 lutines)。总儿茶酚胺的浓度则可通过在 405 nm 处的激发,和在 495 nm 处的测量荧光强度加以确定(这两个波长不能区别肾上腺素和正肾上腺素)。下面是所记录的数据:

I_u = 1.5 毫升尿经处理后使儿茶酚胺类产生荧光时的荧光强度
= 52 单位

I_b = 1.5 毫升尿,用铁氰化物、NaOH 和其它试剂以颠倒次序
处理(不使儿茶酚胺类产生荧光)的荧光强度
= 6 单位

I_s = 1.5 毫升尿中加入了 0.25 微克肾上腺素标准物经处理后的
荧光强度
= 85 单位

计算(a)尿样中儿茶酚胺类的浓度和(b)如果 24 小时内收集的尿量为 900 毫升,儿茶酚胺的日排出总量是多少?

解:

$$\begin{aligned} \text{(a)} \quad \text{尿样中儿茶酚胺类的含量} &= \frac{I_u - I_b}{I_s - I_u} \times 0.25 \text{ 微克} = \frac{52 - 6}{85 - 52} \times 0.25 \\ &= \frac{(46)(0.25)}{(33)} \end{aligned}$$

儿茶酚胺类的数量 = 0.348 微克

$$\text{浓度} = \frac{0.348 \text{ 微克}}{1.5 \text{ 毫升}} = 0.232 \text{ 微克/毫升}$$

$$\text{(b)} \quad \text{总排出量} = (0.232 \text{ 微克/毫升})(900 \text{ 毫升}) = 209 \text{ 微克/天}$$

C. 旋光——旋光测定法

旋光是指某些化合物(固体或在溶液中)旋转偏振光平面的能力。这种具有“光学活性的”化合物至少有一个不对称中心,而且没有对称面。在一定的温度和波长下,某溶液的旋光为

$$A^{\circ} = [\alpha]_{\lambda}^T \times C \times l \quad (7)$$

式中, A° = 观测到的旋光度数,

$[\alpha]_{\lambda}^T$ = 在固定的温度(一般为 20 或 25°C)和波长下(一般为 Na 的 D 线, 5893 Å), 溶液中化合物的比旋,

C = 溶液的浓度, 以克/毫升表示,

l = 光程长度(穿过溶液的)以分米(dm)做单位。

注意, (7) 式与表示吸收率的 (3) 式相似。(7) 式也经常写成

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{A^{\circ} \times 100}{l \times C} \quad (8)$$

在此, C = 浓度, 以 % w/v (即克/100 毫升) 表示。“摩尔旋光”($[\alpha]_M$) 为 $[\alpha] \times MW$ 。

测定旋光的仪器叫做旋光计。旋光计的基本部件见图 5-3。

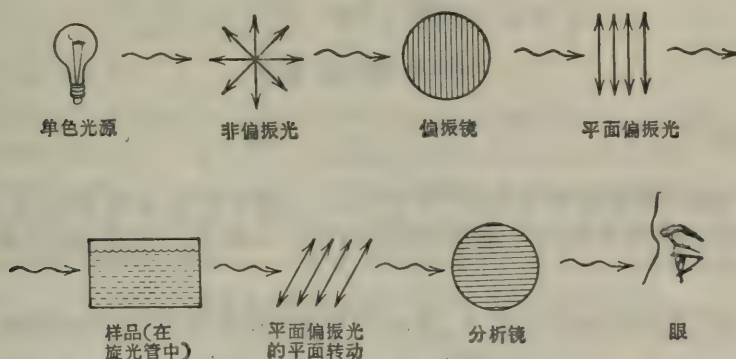


图 5-3 旋光计的基本部件。偏振光在垂直于光传播途径的单个平面上振动。非偏振光在无限多个平面上振动,所有这些平面全与光传播途径垂直。

偏振镜和分析镜都可使平面偏振光透过。在光学活性样品不存在时,可调节分析镜使观测者看到的光强度为最小(转动分析镜直到其透光平面与偏振镜的透光平面相垂直)。光学活性样品使偏振光平面旋转。为了使光强度为最小,则必须转动分析镜到新的位置。分析镜转动的角度就是所观察的旋光(以度表示),据此可计算 $[\alpha]$ 。如果分析镜依顺时针方向转动,旋光性物质称之为右旋的(d 或 $+$)。如果分析镜依逆时针方向转动,旋光性物质称之为左旋的(l 或 $-$)。符号 d 或 l 不要同符号 D 或 L 相混。

旋光可用来鉴定未知化合物,测定已知化合物浓度,以及跟踪那些底物和产物具有不同比旋值的反应过程。旋光色散测量(即在各种不同波长下的旋光)可提供有关化合物的结构和不对称现象的信息(例如蛋白质中 α -螺旋含有的百分数)。

例题 5-18

L-亮氨酸溶液(3.0 克/50 毫升 6 N HCl)在 20 厘米旋光管中测得的旋光度为 $+1.81^\circ$ 。计算 L-亮氨酸在 6 N HCl 中的(a)比旋 $[\alpha]$ 和(b)摩尔旋光 $[\alpha]_M$ 。

解:

$$(a) \quad [\alpha] = \frac{A^\circ}{l_{\text{分米}} \times C_{\text{克/毫升}}} \quad l = 20 \text{ 厘米} = 2 \text{ 分米}$$

$$C = 3 \text{ 克/50 毫升} = 0.06 \text{ 克/毫升}$$

$$[\alpha] = \frac{+1.81}{2 \times 0.06} \quad \text{或} \quad [\alpha] = +15.1^\circ$$

$$(b) \quad [\alpha]_M = [\alpha] \times MW = (+15.1^\circ)(131.2)$$

$$[\alpha]_M = +1980^\circ$$

例题 5-19

L-阿拉伯糖溶液(为 α 型及 β 型的平衡混合液)在 10 厘米旋光管和 25°C 时测得的旋光为 $+23.7^\circ$ 。计算溶液中 L-阿拉伯糖的浓度, α -和 β -L-阿拉伯糖平衡混合液的 $[\alpha]_D^{25}$ 为 $+105^\circ$ 。

解:

$$A^\circ = [\alpha] \times l \times C \quad C = \frac{A^\circ}{[\alpha] \times l} = \frac{23.7}{105}$$

$$C = 0.225 \text{ 克/毫升}$$

例题 5-20

α -和 β -D-葡萄糖平衡混合物的 $[\alpha]_D^{25}$ 为 $+52.7^\circ$ 。纯 α -D-葡萄糖的 $[\alpha]_D^{25}$ 为 $+112^\circ$ 。纯 β -D-葡萄糖的 $[\alpha]_D^{25}$ 为 $+18.7^\circ$ 。计算平衡混合物中 α -和 β -D-葡萄糖的比率。

解:

每一种 α , β 异构体(anomer)对总 A° 或 $[\alpha]_D^{25}$ 所起的作用与其存在的浓度成正比。令

$$X = \% \beta \quad \therefore (100 - X) = \% \alpha$$

$$\therefore (+18.7)(X) + (+112)(100 - X) = (100)(+52.7)$$

$$18.7X + 11,200 - 112X = 5270$$

$$5930 = 93.3X$$

$$X = \frac{5930}{93.3} = \% \beta \quad \beta = 63.5\%$$

$$\therefore \alpha = (100 - 63.5)\% \quad \alpha = 36.5\%$$

例题 5-21

水解 30 克仅含有 D-甘露糖和 D-葡萄糖的多糖。水解液稀释到 100 毫升。此水解液在 10 厘米旋光管中测得的旋光为 $+9.07^\circ$ 。计算多糖中 D-甘露糖/D-葡萄糖的比值, α/β -D-葡萄糖和 α/β -D-甘露糖的比旋分别为 $+52.7^\circ$ 和 $+14.5^\circ$ 。

解:

酸水解后,这两种糖都以 α 型和 β 型的平衡混合物形式存在。此外,由于每水解1摩尔单糖残基(162克)需加入1摩尔水(18克),所以,水解后单糖的总重量为33.3克。

令

X = 每毫升 D-葡萄糖的存在克数

$\therefore (0.333 - X)$ = 每毫升 D-甘露糖的存在克数

$$A_{\text{D}}^{\circ} = [\alpha](l)(C) = (52.7)(1)(X) = 52.7X$$

$$A_{\text{H}}^{\circ} = [\alpha](l)(C) = (14.5)(1)(0.333 - X) = 4.83 - 14.5X$$

$$A_{\text{D}}^{\circ} + A_{\text{H}}^{\circ} = A_{\text{H}}^{\circ}$$

$$(52.7X) + (4.83 - 14.5X) = 9.07$$

$$38.2X = 4.24$$

$$X = \text{每毫升 D-葡萄糖的克数} = \frac{4.24}{38.2}$$

D-葡萄糖 = 0.111 克/毫升

\therefore D-甘露糖 = 0.333 - 0.111 克/毫升

D-甘露糖 = 0.222 克/毫升

由于甘露糖和葡萄糖有相同的分子量,所以两种糖的摩尔比值即为两种糖的重量比值。

D-甘露糖/D-葡萄糖 = 2

练 习 题

答案见第 311—312 页。

1. 计算下列溶液在 1 厘米液槽中, 260 nm 和 340 nm 处的吸收率和透射光: (a) $2.2 \times 10^{-5} M$ NADH, (b) $7 \times 10^{-6} M$ NADH 加 $4.2 \times 10^{-5} M$ ATP. NADH 在 260 nm 处的 a_m 为 $15,000 M^{-1} \times \text{厘米}^{-1}$, 在 340 nm 处为 6220. ATP 在 260 nm 处的 a_m 为 $15,400 M^{-1} \times \text{厘米}^{-1}$, 在 340 nm 处为零。

2. 计算某溶液于下列不同吸收率时 ATP 和 NADPH 的浓度(在 1 厘米液槽中): (a) 在 340 nm 处为 0.15, 在 260 nm 处为 0.90. (b) 在 340 nm 处为零, 在 260 nm 处为 0.75. (c) 在 340 nm 处为 0.22, 在 260 nm 处为 0.531. NADPH 在两种波长下的 a_m 值与“习题 1”中的 NADH 相同。

3. 计算 A 和 B 两种吸光化合物的浓度, 如果这个溶液在 3 厘米液槽和 450 nm 处的吸收率为 0.62, 在 485 nm 处之吸收率为 0.54. 化合物 A 在 450 nm 处的 a_m 为 $12,000 M^{-1} \times \text{厘米}^{-1}$, 在 485 nm 处为 $4000 M^{-1} \times \text{厘米}^{-1}$. 化合物 B 在 450 nm 处的 a_m 为 $5000 M^{-1} \times \text{厘米}^{-1}$, 在 485 nm 处为 $11,600 M^{-1} \times \text{厘米}^{-1}$.

4. 浓度为 1.0 毫克/毫升的牛血清清蛋白标准溶液, 在 280 nm 处的吸收率为 0.58. (a) 如果某个部分提纯的酶制剂在 280 nm 处之吸收率为 0.12, 其蛋白质浓度应是多少? (b) 即便此制剂中不含有核酸类物质, 为什么计算数值可能有误差?

5. 将习题 4 中所述的制剂稀释 5 倍, 测定其在 215 nm 和 225 nm 处的吸收率. ΔA 值为 0.31. (a) 未稀释制剂中蛋白质浓度是多少? (b) 这个值是否比在 280 nm 处测到的吸收率数值更可靠?

6. 假定将 1.5 毫升浓度为 $2 \times 10^{-4} M$ NADPH 的溶液加到 1.5 毫升含有未知浓度的氧化态谷胱甘肽和催化量谷胱甘肽还原酶的溶液中. 此溶液在 340 nm 处和 1 厘米液槽中的最终吸收率为 0.25. 计算在 1.5 毫升原始溶液中氧化态谷胱甘肽的浓度. 谷胱甘肽还原酶所催化的反应式为 $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$, 并且基本上进行到底。

7. 根据 340 nm 处的光吸收, 设计一分光光度测定法, 并用此法测定混合物中果糖-1, 6-二磷酸, 甘油

醛-3-磷酸和二羟丙酮磷酸的浓度。

8. 根据下面资料,计算混合物中柠檬酸和异柠檬酸浓度。(a)向2.0毫升原始溶液中加入1.5毫升含有过量 NAD^+ 和异柠檬酸脱氢酶的溶液后,在1厘米液槽中、340 nm 处的吸收率增加到0.48。(b)再加入3.5毫升含有顺-乌头酸酶的溶液后,吸收率仍保持0.48不变。

9. 已知商品腺苷-5'-磷酸硫酸酐(APS)中污染有5'-AMP。配制一APS溶液,其 $A_{260\text{ nm}}$ 为0.90。准确量取此溶液0.9毫升,与0.1毫升含有过量无机焦磷酸、葡萄糖、 NADP^+ 、 Mg^{2+} 和ATP硫酸化酶、己糖激酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的溶液混合。 $A_{340\text{ nm}}$ 值增加到0.262。计算APS样品的纯度(假定APS和AMP在260 nm处之 a_m 值均为 $15,400\text{ M}^{-1} \times \text{厘米}^{-1}$)。ATP硫酸化酶催化反应 $\text{APS} + \text{PP}_i \rightleftharpoons \text{SO}_4^{2-} + \text{ATP}$ 时,其 K_{eq} 按写出的反应式为 10^8 。

10. 如果将例题5-16中所描述的提取液用邻-硝基苯酚- β -半乳糖苷重作测定;对于2分钟样品来说,NaOH溶液的 $A_{420\text{ nm}}$ 应是多少?邻-硝基苯酚在420 nm处(在碱液中)的 a_m 值为 $21,300\text{ M}^{-1} \times \text{厘米}^{-1}$ (假定使用邻-硝基苯酚- β -半乳糖苷时的反应速度与使用对-硝基苯酚- β -半乳糖苷时相同)。

11. 乳酸脱氢酶的测定是根据在1厘米液槽中用分光光度法跟踪NADH的出现进行的。测定混合物(总体积3.0毫升)中含有过量的乳酸、缓冲剂、0.1毫升酶制剂和氨基脲(用以捕捉丙酮酸,促使反应进行到底)。酶制剂含有120微克蛋白质/毫升。 $A_{340\text{ nm}}$ 之增长速度为0.048/分。问:(a)制剂中乳酸脱氢酶的含量是多少(酶单位/毫升)?(b)制剂中乳酸脱氢酶的比活性是多少(酶单位/毫克蛋白质)?

12. 例题4-24中所提到的心脏学家想校正甘油测定法中使用的商品甘油激酶活性。他制备了一个含有过量 MgATP 、PEP、丙酮酸激酶、乳酸脱氢酶、甘油和 $3 \times 10^{-4}\text{ M}$ NADH的测定混合物,总体积为0.9毫升。加入0.1毫升甘油激酶溶液以启动反应。如果甘油激酶的比活性仍如原样,0.1毫升相当于加入了0.03个活性单位。经过短暂的迟缓,365 nm处的吸收率以0.08/分的速度下降(为了使吸收率读数低于1.0,测定时选用365 nm而不选用340 nm。在365 nm处NADH的 a_m 为 $3.11 \times 10^3\text{ M}^{-1} \times \text{厘米}^{-1}$)。该甘油激酶贮存液真的含有0.3单位/毫升吗?

13. 铅中毒引起粪卟啉日排出量增加,可用尿进行荧光法测定(405 nm处激发,595 nm处测荧光)。取有铅中毒嫌疑的患者尿样0.5毫升,进行适当处理,稀释到25毫升做荧光测定。下面是记录的数据: $I_u=40$, $I_s=5$, $I_0=80$ 。在25毫升测定体积中,加入的内标准物为1.25微克粪卟啉。24小时总排尿量为800毫升。问患者的粪卟啉日排出量是多少?(正常值为75—300微克/天)记住, I_u 代表未知物加空白的荧光强度, I_s 代表内标准物加未知物和空白的荧光强度。

14. D-组氨酸溶液(4克/100毫升1 M HCl)在20厘米旋光管中测得的旋光度为 -0.41° 。计算:(a) D-组氨酸在1 M HCl中的比旋 $[\alpha]$ 和(b) D-组氨酸在1 M HCl中的摩尔旋光 $[\alpha]_M$ 。

15. 某L-核酮糖溶液(为 α 型和 β 型的平衡混合物)在10厘米旋光管中测得的旋光度为 -3.75° 。计算该溶液中L-核酮糖的浓度。 α -和 β -L-核酮糖平衡混合物的 $[\alpha]_D^{25}$ 为 -16.6° 。

16. 某 α -和 β -D-甘露糖平衡混合物的 $[\alpha]_D^{25}$ 为 $+145^\circ$ 。纯 α -D-甘露糖的 $[\alpha]_D^{25}$ 为 $+29.3^\circ$ 。纯 β -D-甘露糖的 $[\alpha]_D^{25}$ 为 -16.3° 。计算该平衡混合物中 α -和 β -D-甘露糖的比率。

17. α -D-甘露糖的 $[\alpha]_D^{25}$ 为 $+29.30^\circ$ 。 β -D-甘露糖的 $[\alpha]_D^{25}$ 为 -16.30° 。某新配制的 α -D-甘露糖溶液,在10厘米旋光管中测得的旋光度为 14.65° 。10分钟后,所测的旋光度降到 $+11.0^\circ$ 。计算总旋现象的净速度。

(吴经才译 董振芳校)

第六章 生物化学中的同位素

A. 同位素和放射衰变

同位素

“同位素”是内含质子数目相同而中子数目不同(原子量不同)的原子。大多数的天然元素都是以同位素的混合物形式出现的。例如: 镁在自然界中是以 ^{24}Mg 、 ^{25}Mg 和 ^{26}Mg 的形式存在, 分别占镁总量的百分之 78.6、10.11 和 11.29, 由于质量的分配, 镁的平均原子量为 24.31。元素的化学性质是由其原子序数而不是由其原子量决定的。因而, 镁的三种同位素都有相同的反应。在生物化学研究中, 对于质量上微小差异所引起的同位素效应, 通常是略去不计的。

放射性衰变的类型

自然界存在的, 以及人造的同位素中, 多数是不稳定的。这些同位素的核, 以表 6-1 中所示方式, 经过一次或几次衰变, 才能达到比较稳定状态。这样的同位素叫作“放射性同位素”。许多同位素由于衰变过程, 从自然界中消失已久。例如: ^{23}Mg 和 ^{27}Mg 在自然界的镁中已不占有显著的比例, 不过为了研究中的使用, 它们可以从适当的核反应中得到。

表 6-1 放射性衰变类型

衰 变 过 程	原 子 核 的 转 变	净 反 应 式
β 粒子辐射	${}_0n^1 \longrightarrow {}_{+1}p^1 + {}_{-1}\beta^0$	${}_A N^I A W \longrightarrow {}_{A N+1} I^A W + {}_{-1}\beta^0$
正粒子辐射	${}_{+1}p^1 \longrightarrow {}_0n^1 + {}_{+1}\beta^0$	${}_A N^I A W \longrightarrow {}_{A N-1} I^A W + {}_{+1}\beta^0$
α 粒子辐射	失去 ${}_2\text{He}^4 (\alpha)$	${}_A N^I A W \longrightarrow {}_{A N-2} I^A W - 4 + {}_2\text{He}^4$
电子捕获 (EC)	${}_{+1}p^1 + {}_{-1}e^0 \longrightarrow {}_0n^1$	${}_A N^I A W + {}_{-1}e^0 \longrightarrow {}_{A N-1} I^A W + \gamma$
粒子辐射后不稳定核的同 质异能的转变		${}_A N^I A W \longrightarrow {}_{A N} I^A W + \gamma$

生物化学研究中使用的放射性同位素, 大多数是 β 和/或 γ 辐射体(附录 XII)。

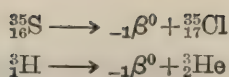
例题 6-1

^{14}C , ^{32}P , ^{35}S 和 ^3H 都是通常用于生物科学研究中的放射性同位素。都是 β 辐射体。写出它们衰变的核反应。

解:

在所有这四种情况中, 都是各自放出一个 β 粒子而成为较原放射性同位素增加一个原子序数的稳定性同位素。原子量同于母体。





放射性衰变的方程式

放射性同位素的衰变是简单的指数(一级)过程.

$$-\frac{dN}{dt} = \lambda N \quad (1)$$

式中, $-\frac{dN}{dt}$ = 每时间小增量内原子衰变的数目(即计数率),

N = 任一给定时间内存在的放射性原子总数目,

λ = 衰变常数. 每种同位素不同.

负号表示放射性原子的数量随时间而减少.

虽然 λ 是个比例常数, 我们通过整理上述方程式可看到它的物理学意义.

$$\begin{aligned} -\frac{dN}{dt} &= \lambda N \quad \therefore \lambda = -\frac{dN}{N dt} \\ \lambda &= -\frac{dN/N}{dt} \end{aligned} \quad (2)$$

换句话说, λ 是每时间小增量放射性原子衰变的部分,

微分衰变方程式可以积分而得到更有用的关系式.

$$-\frac{dN}{dt} = \lambda N \quad \frac{dN}{N} = -\lambda dt \quad \int \frac{dN}{N} = -\lambda \int dt$$

在 N_0 (放射性原子的原始数目) 和 N (在其他任一时间内放射性原子数目) 之间积分以及在零时和其他任一时刻间积分:

$$\begin{aligned} \int_{N_0}^N \frac{dN}{N} &= -\lambda \int_{t=0}^t dt \quad \ln \frac{N}{N_0} = -\lambda t \\ \ln \frac{N_0}{N} &= \lambda t \end{aligned}$$

$$\text{或} \quad 2.3 \log \frac{N_0}{N} = \lambda t \quad \text{或} \quad N = N_0 e^{-\lambda t} \quad (3)$$

或, 以线性形式表示,

$$\log N = -\frac{\lambda}{2.3} t + \log N_0 \quad (4)$$

N_0 和 N 可用任意一致的方式表示. 例如, $N_0 = 100\%$, N = 时间 t 间隔后保留的%; $N_0 = 1.00$, N = 时间 t 间隔后保留的部分(以小数表示); N_0 = 样品中原始的 CPM, N = 时间 t 间隔后保留的 CPM; N_0 = 一定时间的样品的 S. A. (比活), N = 时间 t 后样品的 S. A.

半衰期

放射性同位素的“半衰期”($t_{1/2}$)是原子的原始数量衰变一半所需的时间. $t_{1/2}$ 和 λ 间的关系表示如下:

$$\ln \frac{N_0}{N} = \lambda t \quad \text{或} \quad 2.303 \log \frac{N_0}{N} = \lambda t$$

$$\ln \frac{1}{0.5} = \lambda t_{1/2}$$

$$\ln 2 = \lambda t_{1/2}$$

$$0.693 = \lambda t_{1/2}$$

$$2.303 \log \frac{1}{0.5} = \lambda t_{1/2}$$

$$2.303 \log 2 = \lambda t_{1/2}$$

$$(2.303)(0.301) = \lambda t_{1/2}$$

$$0.693 = \lambda t_{1/2}$$

$$\lambda = \frac{0.693}{t_{1/2}} \quad \text{或} \quad t_{1/2} = \frac{0.693}{\lambda} \quad (5)$$

样品中放射性的保留数量,可通过绘制半对数的线图,简便地测定出来,如图 6-1 所示。绘制该图,单点(一个半衰期的 50%)就足够了。

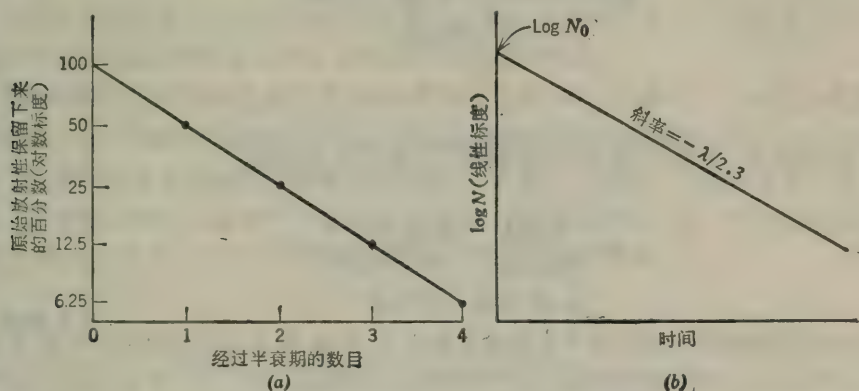


图 6-1 放射性同位素衰变是一级过程

居里

居里,缩写为 Ci,是放射性衰变的标准单位。最初规定 1 居里为 1 克 ^{226}Ra 衰变的速率。由于 ^{226}Ra 的半衰期比较长,所以该同位素作为合适的标准物使用。现在规定 1 居里为凡衰变率每秒钟为 3.700×10^{10} 蜕变 (2.22×10^{12} DPM) 的任意放射性物质的数量。因为大多数的放射性探测装置的效率小于 100%, 给定的居里数字几乎总是低于理论的计数率。因此在 DPM 和 CPM 间是有差别的。例如,某样品含有 1 微居里的放射性物质其衰变率为 2.22×10^6 DPM, 如果只探测到 30% 的蜕变,则观察到的计数率是 6.66×10^5 CPM。

例题 6-2

^{45}Ca 的半衰期是 163 天。计算 (a) 衰变常数 (λ) 以天 $^{-1}$ 和秒 $^{-1}$ 为单位, 和 (b) 90 天以后保留在样品中的初始放射性的百分率。

解:

$$(a) \quad \lambda = \frac{0.693}{t_{1/2}} = \frac{0.693}{163 \text{ 天}} = \frac{6.93 \times 10^{-1}}{1.63 \times 10^2} \text{ 天}^{-1}$$

$$\lambda = 4.25 \times 10^{-3} \text{ 天}^{-1}$$

$$\lambda = \frac{0.693}{163 \text{ 天} \times 24 \text{ 小时/天} \times 60 \text{ 分/时} \times 60 \text{ 秒/分}} = \frac{0.693}{163 \text{ 天} \times 86,400 \text{ 秒/天}}$$

$$= \frac{0.693}{(1.63 \times 10^2)(8.64 \times 10^4)} = \frac{6.93 \times 10^{-2}}{14.1 \times 10^6} \text{ 秒}^{-1}$$

$$\lambda = 4.92 \times 10^{-8} \text{ 秒}^{-1}$$

(b)

$$2.3 \log \frac{N_0}{N} = \lambda t$$

设 $N_0 = 100\%$

$$2.3 \log \frac{100}{N} = (4.26 \times 10^{-3}) (90) = 0.3834$$

$$\log \frac{100}{N} = \frac{0.3834}{2.3} = 0.167$$

$$\log 100 - \log N = 0.0167$$

$$\log N = 2.000 - 0.167 = 1.833$$

$$N = 68.1\%$$

例题 6-3

^{14}C 半衰期为 5700 年, 计算 (a) 每年 (b) 每分钟 ^{14}C 原子衰变分数。

解:

(a) 计算 λ :

$$\lambda = \frac{0.693}{5700 \text{ 年}} = \frac{6.93 \times 10^{-1}}{5.7 \times 10^3} \text{ 年}^{-1}$$

$$\lambda = 1.216 \times 10^{-4} \text{ 年}^{-1}$$

即, 每年每个原子衰变 1.216×10^{-4} 原子或每年有一个原子从 $1/1.216 \times 10^{-4}$ 原子中衰变。

$$\frac{1}{1.216 \times 10^{-4}} = 0.8225 \times 10^4 = 8.225 \times 10^3$$

\therefore 每年每 8225 个放射性原子中有一个原子衰变

(b)
$$\lambda = \frac{1.216 \times 10^{-4} \text{ 年}^{-1}}{(365)(24)(60)} = 2.31 \times 10^{-10} \text{ 分}^{-1}$$

$$\frac{1}{2.31 \times 10^{-10}} = 4.32 \times 10^9$$

每分钟 4.32×10^9 放射性原子衰变中有一个

例题 6-4

^{40}K ($t_{1/2} = 1.3 \times 10^9$ 年) 占自然界中钾的 0.012%。人体中含的钾按体重计大约为 0.35%, 计算在 75 公斤重的人体内来自 ^{40}K 衰变的总放射性。

解:

$$\begin{aligned} \text{总 } ^{40}\text{K} &= 0.012\% \times 0.35\% \times 75 \times 10^3 \text{ 克} = (1.2 \times 10^{-4}) (3.5 \times 10^{-3}) (7.5 \times 10^4) \\ &= 3.15 \times 10^{-2} \text{ 克} \end{aligned}$$

$$^{40}\text{K} \text{ 原子的数目} = \frac{3.15 \times 10^{-2} \text{ 克}}{40 \text{ 克/克原子}} \times 6.023 \times 10^{23} \text{ 原子/克原子} = 4.74 \times 10^{20} \text{ 原子}$$

$$\lambda = \frac{0.693}{1.3 \times 10^9 \times 365 \times 24 \times 60} = \frac{6.93 \times 10^{-1}}{6.83 \times 10^{14}} \text{ 分}^{-1}$$

$$\lambda = 1.014 \times 10^{-15} \text{ 分}^{-1}$$

$$\text{DPM} = -\frac{dN}{dt} = \lambda N = (1.014 \times 10^{-15}) (4.74 \times 10^{20}) = 4.81 \times 10^5 \text{ DPM}$$

或

$$\frac{4.81 \times 10^5 \text{ DPM}}{2.22 \times 10^6 \text{ DPM}/\mu\text{Ci}} = 0.217 \mu\text{Ci}$$

比活性

我们使用放射性作为浓度的量度(从而测定反应速度等), 并不必需化合物中的每个分子都具有放射性. 需要的是样品所含的放射性分子足以能准确地计数, 以及知道化合物的比活性. 比活性(S. A.)指的是每单位数量的物质中放射性的数量. 实际上, 它是标示放射性分子在总分子中所占的分数的一种方法. 比活性的单位可给定为每克居里(Ci/g); 每毫克毫居里(mCi/mg); 每毫摩尔毫居里(mCi/mmole); 每毫摩尔每分钟蜕变数(DPM/mmole); 每微摩尔每分钟计数(OPM/ μmole); 或用任一其他方便的方法. 一旦知道了化合物的比活性, 就可把任一给定的计数率看作是样品中化合物的数量.

在放射性化合物的多数研究中, 都是假设了没有“同位素效应”的, 即假设了放射性分子是随机地分布在全部化合物分子中间, 并且表现的与非放射性分子相同. 对于生物学中所用的大多数同位素来说这样的假设是合理的. ^3H 是一个例外, 它的质量是正常 H 的三倍. 然而, 大多数生物学上重要的 ^3H -标记化合物, 在总分子量方面, 与无标记的化合物分子量相比, 差别并不大. 例如, $^3\text{H}_2\text{O}$ 的分子量只比 $^1\text{H}_2\text{O}$ 大 19%.

例题 6-5

在大气上层, 由于 ^{14}N 与宇宙射线中子的碰撞 ^{14}C 不断地产生出来, 其反应式为 $^{14}\text{N} + n^1 \rightarrow ^{14}\text{C} + ^1\text{H}$. 结果, 地球上普遍为生物合成的全部含碳化合物, 所含的 ^{14}C 足以使每克碳产生 13 DPM. 有机体死后, 其 ^{14}C 衰变的半衰期仍是 5700 年. 计算(a) ^{14}C 在参与今日地球表面碳循环的碳中所占的丰度, 和(b)内含 3 DPM/克碳的某生物物质样品的年龄.

解:

$$(a) \quad \text{DPM/g} = -\frac{dN}{dt} = \lambda N$$

式中, N = 每克碳中 ^{14}C 原子数目和 λ = 衰变常数, 对 ^{14}C 来说, 是 $2.31 \times 10^{-10} \text{ 分}^{-1}$.

$$13 = 2.31 \times 10^{-10} N$$

$$N = \frac{13}{2.31 \times 10^{-10}} = 5.63 \times 10^{10} \text{ 原子 } ^{14}\text{C}/\text{克碳}$$

1 克碳含有

$$\frac{1 \text{ 克}}{12 \text{ 克/克原子}} \times 6.023 \times 10^{23} \text{ 原子/克原子} = 5.02 \times 10^{22} \text{ 碳的总原子}$$

$$\text{丰度} = \frac{5.63 \times 10^{10} \text{ 原子 } ^{14}\text{C}}{5.02 \times 10^{22} \text{ 总原子碳}} \times 100\% = 1.12 \times 10^{-10}\%$$

$$(b) \quad 2.3 \log \frac{13}{3} = \lambda t$$

式中, $\lambda = 1.216 \times 10^{-4} \text{ 年}^{-1} (^{14}\text{C})$

$$2.3 \log 4.33 = 1.216 \times 10^{-4} t$$

$$(2.3)(0.636) = 1.216 \times 10^{-4} t$$

$$t = \frac{(2.3)(0.636)}{1.216 \times 10^{-4}} \quad \text{年龄} = t = 12,029 \text{ 年}$$

核对： ^{14}C 活性已经衰变到大约是其原始水平的 $\frac{1}{5}$ ，5700 年后它将衰变到 $\frac{1}{2}$ ，11,400 年(2 个半衰期)后它将衰变到 $\frac{1}{4}$ ，17,100 年(3 个半衰期)后它将衰变到 $\frac{1}{8}$ 。因此，这个样品的年龄介于 2 和 3 个半衰期之间。

无载体同位素的比活性

例题 6-6

(a) 以 DPM/克，居里/克，和居里/克原子为单位纯 ^{14}C 的比活性各为多少？(b) 制备 L-苯丙氨酸- ^{14}C (均匀的)的理论上最大比活性是多少？(c) 在比活性为 200 毫居里/毫摩尔的 L-苯丙氨酸- ^{14}C 制备中，实际上受到标记的分子占多大比例？ $\lambda = 2.31 \times 10^{-10} \text{分}^{-1}$ 。

解：

$$\begin{aligned} \text{(a)} \quad 1 \text{ 克 } ^{14}\text{C} &= \frac{1 \text{ 克}}{14 \text{ 克/克原子}} = 0.0714 \text{ 克原子} \\ N &= 0.0714 \text{ 克原子} \times 6.023 \times 10^{23} \text{ 原子/克原子} \\ N &= 4.3 \times 10^{22} \text{ 原子} \\ \frac{\text{DPM}}{\text{g}} &= -\frac{dN}{dt} = \lambda N \end{aligned}$$

式中， $N=1$ 克 ^{14}C 中的原子数目。

$$\begin{aligned} \text{DPM} &= 2.31 \times 10^{-10} \text{ 分}^{-1} \times 4.3 \times 10^{22} \text{ 原子} \\ \text{比活性} &= 9.94 \times 10^{12} \text{ DPM/克} \end{aligned}$$

$$\text{或} \quad \frac{9.94 \times 10^{12} \text{ DPM/克}}{2.22 \times 10^{12} \text{ DPM/Ci}} = 4.48 \text{ 居里/克}$$

$$\text{或} \quad 4.48 \text{ 居里/克} \times 14 \text{ 克/克原子} = 62.7 \text{ 居里/克原子}$$

(b) 每摩尔 L-苯丙氨酸含 9 克原子碳，如上所示，纯 ^{14}C 的比活性是 62.7 居里/克原子。

\therefore 最大比活性 = 9 克原子/摩尔 \times 62.7 居里/克原子 = 564 居里/摩尔

$$\text{(c)} \quad \frac{200 \text{ 居里/摩尔}}{564 \text{ 居里/摩尔}} \times 100 = ^{14}\text{C} \text{ 标记分子的百分数} = 35.5\%$$

例题 6-7

计算在 1 居里纯 ^{32}P 中(a)放射性原子的数目，和(b)克磷为单位的重量，(c)计算纯 ^{32}P 的比活性。 ^{32}P 的半衰期是 14.3 天。

解：

(a) 1 居里 = 2.22×10^{12} DPM，首先计算 λ 以分 $^{-1}$ 为单位。

$$\begin{aligned} \lambda &= \frac{0.693}{14.3 \times 24 \times 60} = \frac{0.693}{2.06 \times 10^4} = \frac{6.93 \times 10^{-1}}{2.06 \times 10^{-4}} \text{ 分}^{-1} \\ \lambda &= 3.36 \times 10^{-5} \text{ 分}^{-1} \end{aligned}$$

$$\text{DPM} = -\frac{dN}{dt} = \lambda N$$

$$2.22 \times 10^{12} = 3.36 \times 10^{-5} N$$

$$N = \frac{2.22 \times 10^{12}}{3.36 \times 10^{-5}} = 0.66 \times 10^{17}$$

$$N = 6.6 \times 10^{16} \text{ 原子/居里}$$

(b) 1 克原子的 ^{32}P (即 32 克) 内含 6.023×10^{23} 原子, $\therefore 6.6 \times 10^{16}$ 原子的重量为

$$\frac{6.6 \times 10^{16}}{6.023 \times 10^{23}} \times 32 \text{ 克} = 3.51 \times 10^{-6} \text{ 克}$$

(c) 纯 ^{32}P 含 6.6×10^{16} 原子/居里; 或

$$\frac{1 \text{ 居里}}{6.6 \times 10^{16} \text{ 原子}} = 1.515 \times 10^{-17} \text{ 居里/原子}$$

$$1.515 \times 10^{-17} \text{ 居里/原子} \times 6.023 \times 10^{23} \text{ 原子/克原子} = 9.125 \times 10^6 \text{ 居里/克原子}$$

或

$$\frac{9.125 \times 10^6 \text{ 居里/克原子}}{32,000 \text{ 毫克/克原子}} = 285.2 \text{ 居里/毫克}$$

关于纯同位素(“无载体”或“100% 富标记的”同位素)的比活性与其半衰期关系的通式是容易推导的。

$$\text{DPM} = -\frac{dN}{dt} = \lambda N = \frac{0.693}{t_{1/2}(\text{分})} N$$

$$\frac{\text{DPM}}{\text{克原子}} = \frac{0.693}{t_{1/2}(\text{分})} \times 6.023 \times 10^{23}$$

如果给定 $t_{1/2}$ 是天数, 比活性是居里/克原子:

$$\text{S. A.} = \frac{(0.693)(6.023 \times 10^{23})}{(t_{1/2})(24)(60)(2.22 \times 10^{12})}$$

$$\text{S. A. 居里/克原子} = \frac{1.305 \times 10^8}{t_{1/2}(\text{天})}$$

或

$$\text{S. A. 居里/克} = \frac{1.305 \times 10^8}{\text{AW} \times t_{1/2}(\text{天})} \quad (6)$$

式中, AW = 同位素的原子量。

B. 放射性化合物的溶液

例题 6-8

一瓶 2.0 毫升的溶液内含 1 毫居里(均匀标记的) L-苯丙氨酸- ^{14}C 。该标记的氨基酸的比活性给定为 150 毫居里/毫摩尔。计算(a)溶液中 L-苯丙氨酸浓度和(b)在计数效率为 80% 条件下溶液的活性, 以 CPM/毫升为单位。

解:

(a) 由于 1 毫摩尔相当于 150 毫居里, 我们能够计算相当于 1 毫居里的毫摩尔数:

$$\frac{1 \text{ 毫摩尔}}{150 \text{ 毫居里}} = 0.00667 \text{ 毫摩尔/毫居里}$$

该 1 毫居里是溶于 2.0 毫升中。

$$\therefore \text{浓度} = \frac{6.67 \times 10^{-3} \text{ 毫摩尔}}{2.0 \text{ 毫升}} = 3.335 \times 10^{-3} \text{ 毫摩尔/毫升}$$

$$\text{浓度} = 3.335 \times 10^{-3} M$$

(b)

$$1 \text{ 居里} = 2.22 \times 10^{12} \text{ DPM}$$

$$\therefore 1 \text{ 毫居里} = 2.22 \times 10^9 \text{ DPM}$$

$$\text{总活性} = (0.8)(2.22 \times 10^9) \text{ DPM} = 1.775 \times 10^9 \text{ CPM 在 } 2.0 \text{ 毫升中}$$

$$\frac{1.775 \times 10^9 \text{ CPM}}{2.0 \text{ 毫升}} = 0.888 \times 10^9 \text{ CPM/毫升}$$

$$\text{活性} = 8.88 \times 10^8 \text{ CPM/毫升}$$

例题 6-9

L-谷氨酸- ^{14}C 溶液(标记均匀的)每毫升含 1.0 毫居里, 和 0.25 毫克谷氨酸. 计算标记的氨基酸的比活性, 以下列单位表示: (a) 毫居里/毫克, (b) 毫居里/毫摩尔, (c) DPM/微摩尔, 和 (d) CPM/微摩尔, 在计数效率为 70% 时.

解:

$$(a) \quad S. A. = \frac{1.0 \text{ 毫居里}}{0.25 \text{ 毫克}} = 4.0 \text{ 毫居里/毫克}$$

$$(b) \quad S. A. = 4.0 \text{ 毫居里/毫克} \times 147.1 \text{ 毫克/毫摩尔}$$

$$S. A. = 588 \text{ 毫居里/毫摩尔}$$

$$(c) \quad S. A. = \frac{588 \text{ 毫居里}}{1 \text{ 毫摩尔}} = \frac{588 \text{ 毫居里}}{1000 \text{ 微摩尔}} = 0.588 \text{ 毫居里/微摩尔}$$

$$S. A. = 0.588 \text{ 毫居里/微摩尔} \times 2.22 \times 10^9 \text{ DPM/毫居里}$$

$$S. A. = 1.305 \times 10^9 \text{ DPM/微摩尔}$$

(d) 1 微摩尔的 L-谷氨酸含 5 微摩尔的碳.

$$\therefore S. A. = \frac{1.305 \times 10^9}{5} \text{ DPM/微摩尔碳} = 0.261 \times 10^9 \text{ DPM/微摩尔碳}$$

在 70% 效率条件下

$$S. A. = (0.70)(2.61 \times 10^8)$$

$$S. A. = 1.83 \times 10^8 \text{ CPM/微摩尔碳}$$

例题 6-10

叙述对 100 毫升, $10^{-2} M$ 的 L-蛋氨酸- ^{35}S 溶液, 其中氨基酸比活性为 $1.5 \times 10^5 \text{ DPM/微摩尔}$ 的制备. 假定可用的有 $0.1 M$ 未标记的 L-蛋氨酸溶液和 L-蛋氨酸- ^{35}S (30 毫居里/毫摩尔和 1 毫居里/毫升) 的储备溶液.

解:

首先, 计算所需放射性的数量.

$$10^{-2} M = 10 \text{ 微摩尔/毫升}$$

$$10 \text{ 微摩尔/毫升} \times 100 \text{ 毫升} = 1000 \text{ 微摩尔}$$

$$1000 \text{ 微摩尔} \times 1.5 \times 10^5 \text{ DPM/微摩尔} = 1.5 \times 10^8 \text{ DPM}$$

其次, 计算为提供 $1.5 \times 10^8 \text{ DPM}$ 所需的放射性储备溶液数量.

$$1 \text{ 毫居里/毫升} \times 2.22 \times 10^9 \text{ DPM/毫居里} = 2.22 \times 10^9 \text{ DPM/毫升}$$

$$\frac{1.5 \times 10^8 \text{ DPM}}{2.22 \times 10^9 \text{ DPM/毫升}} = 0.676 \times 10^{-1} \text{ 毫升} = 67.6 \text{ 微升}$$

于是, 67.6 微升的放射性储备溶液提供了所需的放射性. 再次, 计算 67.6 微升是否也

提供任何有意义数量的 L-蛋氨酸储备溶液。

$$\frac{1 \text{ 毫摩尔}}{30 \text{ 毫居里}} = 0.0333 \text{ 毫摩尔/毫居里}$$

因为储备溶液含 1 毫居里/毫升，其浓度为 0.0333 毫摩尔/毫升，或 33.3 微摩尔/毫升。在 67.6 微升中，我们有

$$0.0676 \text{ 毫升} \times 33.3 \text{ 微摩尔/毫升} = 2.25 \text{ 微摩尔}$$

在大多数的操作中，取自放射性储备溶液 (2.25 微摩尔) 的 L-蛋氨酸添加量和总体 (1000 微摩尔) 相比是太小了，可以略去不计。我们可以把放射性储备溶液看作好象是“无载体”——好象它只有放射性而无质量。

∴ 取 67.6 微升的放射性 L-蛋氨酸-³⁵S 溶液，加入 10.0 毫升 0.1 M (1000 微摩尔) 无放射性 L-蛋氨酸溶液，然后加水使最终体积达到 100 毫升。

例题 6-11

10 毫升的 $10^{-3} M$ 未标记的 L-蛋氨酸溶液和前一例题所叙述的 100 微升的 L-蛋氨酸-³⁵S 储备溶液相混合，并稀释到最后体积为 100 毫升。最后溶液中 L-蛋氨酸-³⁵S 的 (a) 浓度和 (b) 比活性各是多少？

解：

(a) 未标记的 L-蛋氨酸溶液含

$$0.010 \text{ 升} \times 0.001 M = 10^{-5} \text{ 摩尔} = 10 \text{ 微摩尔}$$

放射性溶液含

$$33.3 \text{ 微摩尔/毫升} \times 0.1 \text{ 毫升} = 3.33 \text{ 微摩尔}$$

最后溶液将含

$$\begin{aligned} 10 + 3.33 &= 13.33 \text{ 微摩尔/100 毫升} = 133.3 \text{ 微摩尔/升} \\ &= 133.3 \times 10^{-6} M = 1.333 \times 10^{-4} M \end{aligned}$$

(b) 放射性储液提供了

$$1 \text{ 毫居里/毫升} \times 0.1 \text{ 毫升} = 0.1 \text{ 毫居里}$$

$$S. A. = \frac{0.1 \text{ 毫居里}}{13.33 \text{ 微摩尔}} = \frac{100 \text{ 微居里}}{13.33 \text{ 微摩尔}}$$

$$S. A. = 7.5 \text{ 微居里/微摩尔 (或 7.5 毫居里/毫摩尔或 7.5 居里/摩尔)}$$

以 DPM 为单位：

$$S. A. = 7.5 \text{ 微居里/微摩尔} \times 2.22 \times 10^6 \text{ DPM/微居里}$$

$$S. A. = 16.65 \times 10^6 \text{ DPM/微摩尔}$$

注意，在例题 6-11 中，放射性储液提供的 L-蛋氨酸数量与非放射性溶液所提供的数量相比是有意义的。

C. 使用放射性底物的测定法

下列例题介绍了放射性测定法在生物化学实验室中的应用。

未知体积的测定

例题 6-12

10 微居里 ^{14}C 标记的菊粉加到 15.0 毫升的酵母悬浮液中。该悬浮液经离心后，仔细地抽去其上清液。沉积的酵母小片占据了 0.2 毫升体积，内含 10,000 CPM，其计数效率为 25%。计算沉积酵母小片的间隙空间比例，假定酵母细胞对菊粉完全没有通透性，而且菊粉并不吸附在细胞表面。

解：

悬浮液的原始“比活性”是 10 微居里/15 毫升或 0.667 微居里/毫升。因为酵母细胞占总体积的比例很小，我们可以假定胞外液每毫升含 0.667 微居里。然而为了较准确的计算，我们可设酵母细胞所占悬浮液的体积至少是和沉积酵母小片的体积相同。于是，胞外液的比活性为

$$\frac{10 \text{ 微居里}}{15.0 - 0.2 \text{ 毫升}} = \frac{10}{14.8} = 0.676 \text{ 微居里/毫升}$$

在给定计数条件下(例如，0.2 毫升的沉积酵母细胞铺在金属板上并烘干或悬浮在给定体积的闪烁液中)计数效率为 25%。

∴ 1 毫升的胞外液相当于

$$0.676 \text{ 微居里/毫升} \times 2.22 \times 10^6 \text{ DPM/微居里} \times 0.25 = 3.75 \times 10^5 \text{ CPM/毫升}$$

$$\therefore \text{间隙体积} = \frac{10 \times 10^3 \text{ CPM}}{3.75 \times 10^5 \text{ CPM/毫升}} = 2.67 \times 10^{-2} \text{ 毫升}$$

沉积酵母小片含

$$\frac{0.0267 \text{ 毫升细胞间隙空间}}{0.2 \text{ 毫升总体积}} = 0.134 \text{ 毫升细胞间隙空间/毫升沉积细胞}$$

或

$$13.4\% \text{ 间隙体积}$$

胞内浓度的测定

例题 6-13

某微生物生长在合成培养基中，内含 $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ 为硫的唯一来源。培养基中的 $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ 初始浓度是 $7 \times 10^{-3} \text{ M}$ 。1 毫升培养基含 $2 \times 10^6 \text{ CPM}$ 放射性。生长几天以后，采取细胞、洗涤、并用沸水抽提。用离子交换层析法将抽提物分离成几部分。在 L-蛋氨酸组分中，细胞的 1 克湿重含 53,000 CPM 的 ^{35}S 。计算该有机体中胞内 L-蛋氨酸的浓度，假定 1 克湿重含 0.2 克干细胞成份和 0.8 毫升胞内水。

解：

将 CPM 换算成摩尔，我们必须首先知道 ^{35}S 的比活性。我们已知道原始培养基含 $7 \times 10^{-3} \text{ M}$ $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ (即，7 微摩尔/毫升)以及 $2 \times 10^6 \text{ CPM/毫升}$ 。

$$\text{S. A.} = \frac{2 \times 10^6 \text{ CPM/毫升}}{7 \text{ 微摩尔/毫升}} = 0.286 \times 10^6 \text{ CPM/微摩尔}$$

$$\text{S. A.} = 2.86 \times 10^5 \text{ CPM/微摩尔}$$

该有机体中所有的硫化化合物都来自 $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ 。因而，每分子含 1 个原子硫的所有硫化化合物的比活性，也是 $2.86 \times 10^5 \text{ CPM/微摩尔}$ 。

$$\therefore \text{L-蛋氨酸的数量} = \frac{53,000 \text{ CPM}}{2.86 \times 10^5 \text{ CPM/微摩尔}} = \frac{5.3 \times 10^4}{2.86 \times 10^5} \text{ 微摩尔} \\ = 0.185 \text{ 微摩尔}$$

该 L-蛋氨酸来自 0.8 毫升的胞内水中。

$$\therefore \text{胞内 L-蛋氨酸的浓度} = \frac{1.85 \times 10^{-1} \text{ 微摩尔}}{0.8 \text{ 毫升}} = 2.31 \times 10^{-1} \text{ 微摩尔/毫升} \\ = 2.31 \times 10^{-4} \text{ 摩尔/升}$$

$$\text{胞内 L-蛋氨酸的浓度} = 2.31 \times 10^{-4} M$$

酶及转运测定法

例题 6-14

葡糖-1-磷酸- ^{14}C (均匀的标记, 比活性为 16,000 CPM/微摩尔)与糖原, 在含有糖原磷酸化酶的无细胞抽提液中培育。在初速度为 2550 CPM/分钟时将放射性掺入糖原引子。(a)计算酶的反应速率, 以掺入微摩尔葡萄糖/分来表示。(b)计算该速率, 以微摩尔 \times 升 $^{-1}\times$ 分 $^{-1}$ 为单位, 设反应体积为 0.2 毫升。(c)计算该速率, 以微摩尔 \times 蛋白质毫克 $^{-1}\times$ 分 $^{-1}$ 为单位, 设培育混合物含 0.35 毫克蛋白质。(d)计算该制剂的比(酶)活性。

解:

$$(a) \quad v = \frac{2550 \text{ CPM/分}}{16,000 \text{ CPM/微摩尔}} = \frac{2.55 \times 10^3}{1.6 \times 10^4} \text{ 微摩尔/分} \\ v = 1.59 \times 10^{-1} \text{ 微摩尔/分} \\ v = 0.159 \text{ 微摩尔/分}$$

$$(b) \quad v = \frac{0.159 \text{ 微摩尔/分}}{0.2 \text{ 毫升}} = \frac{15.9 \times 10^{-2} \text{ 微摩尔/分}}{2 \times 10^{-4} \text{ 升}} \\ v = 795 \text{ 微摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$$

$$(c) \quad v = \frac{0.159 \text{ 微摩尔/分}}{0.35 \text{ 毫克蛋白质}} \\ v = 0.454 \text{ 微摩尔} \times \text{毫克蛋白质}^{-1} \times \text{分}^{-1}$$

$$(d) \quad \text{S. A.} = 0.454 \text{ 单位毫克蛋白质}$$

例题 6-15

1 克湿重的青霉属黄色青霉菌(*Penicillium chrysogenum*)菌丝体(ATP-硫酸化酶阴性突变体)悬浮在 100 毫升缓冲液中。在零时加入 1 毫升 $10^{-3} M \text{ K}_2^{35}\text{SO}_4$ 溶液(在标准计数条件下 10 微升 $\text{K}_2^{35}\text{SO}_4$ 储备液含 1.2×10^4 CPM)。每隔 30 秒钟取四等份 5 毫升菌丝体悬浮液过滤, 洗涤菌丝垫, 然后在闪烁液中计数。样品计数如下: 30 秒时 10,600 CPM; 60 秒时 21,000 CPM; 90 秒时 31,200 CPM; 120 秒时 41,900 CPM。初步的实验确定了菌丝垫含 85% 水和 15% 干物质。(a)计算硫酸盐转运速率, 以微摩尔 \times 克干重 $^{-1}\times$ 分 $^{-1}$ 为单位。(b)经 3 小时和 4 小时培育后取最后的样品。在这些时间里菌丝体生长过于“旺盛”, 以致不能精确计数, 但在这两个时间里培养基都含 220 CPM/毫升。估算硫酸盐转运系统的 K_m 。

解:

(a) $\text{K}_2^{35}\text{SO}_4$ 储备溶液($10^{-3} M$)含 1 微摩尔/毫升。

∴ 10 微升 = 0.01 毫升 \approx 0.01 微摩尔

$$S. A. = \frac{1.2 \times 10^4 \text{ CPM}}{0.01 \text{ 微摩尔}} = 1.2 \times 10^6 \text{ CPM/微摩尔}$$

菌丝体转运 $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ 的起始速率约为 $21,000 \text{ CPM} \times \text{分}^{-1} \times \text{样品}^{-1}$ 。每 5 毫升样品含

$$\frac{(1.0 \text{ 克湿重}) \times (0.15 \text{ 克干重/克湿重}) \times (5 \text{ 毫升})}{100 \text{ 毫升}} = 0.0075 \text{ 克菌丝体干重}$$

在干重量基础上的起始转运速率是

$$\frac{(21,000 \text{ CPM} \times \text{分}^{-1} \times \text{样品}^{-1})}{(1.2 \times 10^6 \text{ CPM} \times \text{微摩尔}^{-1}) (7.5 \times 10^{-3} \text{ 克} \times \text{样品}^{-1})} = 2.33 \text{ 微摩尔} \times \text{克}^{-1} \times \text{分}^{-1}$$

(b) 1 克湿重的菌丝体大约含 0.85 毫升胞内水。于是，在悬浮液中外部的（即：培养基）/内部的（即：细胞的）体积之比大约是 118:1。在外部溶液中减少 1 微摩尔/毫升，相当于内部体积中增加 118 微摩尔/毫升。用 3 或 4 小时，外部培养基含

$$\frac{220 \text{ CPM/毫升}}{1.2 \times 10^6 \text{ CPM/微摩尔}} = 1.83 \times 10^{-4} \text{ 微摩尔/毫升} = 1.83 \times 10^{-7} M \text{ } ^{35}\text{SO}_4^{2-}$$

在零时，培养基含 $0.01 \text{ 微摩尔/毫升} = 10^{-5} M \text{ } ^{35}\text{SO}_4^{2-}$ 。培养基已消耗了的

$$(1,000 \times 10^{-5}) - (0.0183 \times 10^{-5}) = 0.9817 \times 10^{-5} M \text{ } ^{35}\text{SO}_4^{2-}$$

菌丝体积累了

$$(0.9817 \times 10^{-5}) (118) = 1.158 \times 10^{-3} M \text{ } ^{35}\text{SO}_4^{2-}$$

$$K_{\text{平}} = \frac{1.158 \times 10^{-3}}{1.83 \times 10^{-7}} = 6330$$

酶测定法中同位素的竞争

例题 6-16

I 竞争性地抑制了某酶促反应 $S \rightarrow P$ 。其测定法是以移植放射性标记 S 进入 P 为基础的。在标准测定条件下， $K_m = 2.3 \times 10^{-5} M$ ，和 $V_{\text{最大}} = 290 \text{ 纤摩尔/分}$ ， $K_i = 2.3 \times 10^{-5} M$ ，标记 S 的比活性是 $4.5 \times 10^5 \text{ CPM/微摩尔}$ 。(a) 当 $[S] = 2.3 \times 10^{-5} M$ 时，观察到的速度以每分钟标记移进 P 的 CPM 为单位是多少？(b) 如果加入了五倍超量的未标记的 S 时，观察到的速率 (CPM/分) 会是多少？(c) 如果加入了五倍超量 I 时，观察到的速率 (CPM/分) 会是多少？

解：

(a) 当 $[S] = 2.3 \times 10^{-5} M = K_m$ ， $v = 0.5 V_{\text{最大}}$ 。

$$v = (0.5) (290 \text{ 纤摩尔/分}) (4.5 \times 10^5 \text{ CPM/纤摩尔})$$

$$v = 62,250 \text{ CPM/分}$$

(b) 添加 (5) ($2.3 \times 10^{-5} M$) 未标记的 S，使底物比活性降低到原来的 $\frac{1}{6}$ 。

$$S. A. = \frac{4.5 \times 10^5 \text{ CPM/纤摩尔}}{6} = 75 \text{ CPM/纤摩尔}$$

$[S]$ 中增加到 $6K_m$ ，实际速度增加到 $\frac{6}{7}$ 的 $V_{\text{最大}} = 0.857 V_{\text{最大}}$ 。

$$v = (0.857) (290) = 248.6 \text{ 纤摩尔/分}$$

观察到的速度是以 CPM/分为单位。

$$v = (248.6) (75) = 18,643 \text{ CPM/分}$$

与原始 v_0 , 62,250 比较, 我们观察到

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{18,645}{62,250} = 0.3 \quad \text{或} \quad i\% = 70$$

因此, 我们观察到 70% 表观抑制 (如果用观察到的 CPM/分和原始未稀释 S 的比活性计算 v , 并以纤摩尔/分为单位表示, 可观察到同样的表观抑制)。

$$(c) \quad v_i = \frac{[S]V_{\text{最大}}}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

$$\begin{aligned} v_i &= \frac{(2.3 \times 10^{-5})(290)}{(2.3 \times 10^{-5}) \left(1 + \frac{11.5 \times 10^{-5}}{2.3 \times 10^{-5}}\right) + 2.3 \times 10^{-5}} \\ &= \frac{6.67 \times 10^{-3}}{(2.3 \times 10^{-5})(6) + 2.3 \times 10^{-5}} = \frac{6.67 \times 10^{-3}}{1.61 \times 10^{-4}} = 41.43 \text{ 纤摩尔/分} \\ v_i &= (41.43)(4.5 \times 10^3) = 18,643 \text{ CPM/分} \end{aligned}$$

我们看到, 添加了未标记的底物如同等浓度的竞争性抑制剂一样, 产生了抑制的同样表观程度, 即, $K_i = K_m$ 。如果由 I 引起的抑制程度比由等浓度未标记 S 引起的低, 那么我们就断定 $K_i > K_m$ 。如果由 I 引起的抑制程度比等浓度未标记 S 引起的高, 则 $K_i < K_m$ 。

例题 6-17

如上所示, 与标记底物相比, 未标记底物的作用象竞争性抑制剂。这个代替现象可在某已知为不含真正抑制剂的溶液中用于测定底物的未知浓度。例如, 假定含有未标记 S 的 0.1 毫升柱组分是包括在含 $[S^*] = 2.3 \times 10^{-5} M$ 和 $[E]$, 足以产生 $V_{\text{最大}}$ 为 290 纤摩尔/分的 1.0 毫升标准反应体积中。所观察到的起始速度是 48,000 CPM/分。柱组分中未标记 S 的浓度是多少?

解:

未标记底物的作用如同竞争性抑制剂。其 K_i 等于 K_m 。于是, 从第四章方程式 (42) 中, 我们可写出以下的相对活性公式:

$$\frac{v_i}{v_0} = a = \frac{K_m + [S^*]}{K_m \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) + [S^*]} = \frac{K_m + [S^*]}{K_m + [S] + [S^*]}$$

式中, $[S^*]$ = 给定比活性的标记底物浓度,

$[S]$ = 未标记底物浓度。

解 $[S]$:

$$[S] = \frac{(K_m + [S^*])(1-a)}{a} \quad (7)$$

$$a = \frac{48,000}{62,250} = 0.771 \quad (1-a) = 0.229$$

$$[S] = \frac{(4.6 \times 10^{-5})(0.229)}{(0.771)} = 1.37 \times 10^{-5} M$$

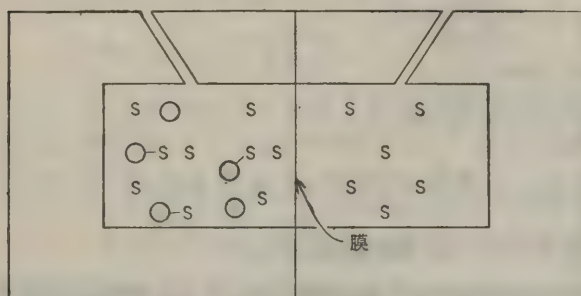
该培养物含 $1.37 \times 10^{-5} M$ 未标记 S, 和 $2.3 \times 10^{-5} M$ 标记 S, 其比活性为 4.5×10^5 CPM/微摩尔。未标记 S 原来就存在于 0.1 毫升柱组分中。于是, 该组分中的 S 浓度是

$$1.37 \times 10^{-4} M$$

平衡结合测定法

例题 6-18

从大肠杆菌中提纯某一氨基酸结合蛋白质(MW=35,000)。将该蛋白质溶液(0.5 毫克/毫升)放在平衡透析室的一个隔间内(0.10 毫升正室)。再将 L-亮氨酸- ^{14}C (S. A. = 2×10^7 CPM/微摩尔)的溶液放在另一隔间内(0.10 毫升负室),平衡时,“正”室的 10 微升溶液含 4600 CPM,“负”室中的 10 微升溶液含 3400 CPM,计算结合的 L-亮氨酸- ^{14}C 的浓度,以及蛋白质-亮氨酸复合体的 K_s 。假定每个蛋白质分子有一个结合部位。



“正”室
 $V_{(+)} = 0.10$ 毫升
 $[S] + [PS] = 46,000 \text{ CPM}$
 $= 2.3 \times 10^{-5} M$
 $[P] + [PS] = 1.43 \times 10^{-5} M$
 $[PS] = 0.6 \times 10^{-5} M$
 $[P] = 0.83 \times 10^{-5} M$

图 6-2 平衡透析室。将蛋白质放进一小室。标记底物放进一个或两个小室。膜限制了蛋白质进入另一室,但底物能够自由穿过膜。平衡后,两室内游离的[S]是相同的,但在含蛋白质的小室内的 S 总浓度要大些,因为结合底物(PS)不能均衡地穿过膜。

“负”室
 $V_{(-)} = 0.10$ 毫升
 $[S] = 34,000 \text{ CPM}$
 $= 1.7 \times 10^{-5} M$

解: 在“正”室中,结合的浓度+游离 L-亮氨酸- ^{14}C 为

$$\begin{aligned} & \frac{4600 \text{ CPM/微升}}{2 \times 10^7 \text{ CPM/微摩尔}} \\ &= 2.3 \times 10^{-4} \text{ 微摩尔/10 微升} \\ &= 2.3 \times 10^{-3} \text{ 微摩尔/毫升} \\ &= 2.3 \times 10^{-5} \text{ 毫摩尔/毫升} \\ &= 2.3 \times 10^{-5} M \end{aligned}$$

在“负”室中,游离的 L-亮氨酸- ^{14}C 浓度:

$$\begin{aligned} & \frac{3400 \text{ CPM/10 微升}}{2 \times 10^7 \text{ CPM/微摩尔}} = 1.7 \times 10^{-4} \text{ 微摩尔/10 微升} = 1.7 \times 10^{-2} \text{ 微摩尔/毫升} \\ &= 1.7 \times 10^{-5} \text{ 毫摩尔/毫升} = 1.7 \times 10^{-5} M \end{aligned}$$

结合 L-亮氨酸- ^{14}C 的浓度即“正”室中的结合+游离 L-亮氨酸- ^{14}C 和“负”室中游离 L-亮氨酸- ^{14}C 之差:

$$\begin{aligned} [\text{L-亮氨酸-}^{14}\text{C}]_b &= (2.3 \times 10^{-5} M) - (1.7 \times 10^{-5} M) \\ [\text{L-亮氨酸-}^{14}\text{C}]_b &= 0.6 \times 10^{-5} M \end{aligned}$$

其余的计算表示在例题 4-11 中。图 6-2 表示标记和蛋白质的分布。

D. 双重标记分析法

某给定放射性同位素以扩展到某最大值的连续能量分布方式放射 β 粒子(例如: ^3H , 0.0176 兆电子伏; ^{14}C , 0.155 兆电子伏; ^{32}P , 1.701 兆电子伏)。当二种具有不同放射性能谱的同位素混合在一起时,混合物中的任一种含量可用选择性地测量不同能量水平时的放射性做法而加以测定。这样的测量使用两通道闪烁计数器是容易完成的。有时,不能达到 100% 的鉴别,因为一个通道里(或两条)测到的活性会是来自两个同位素。尽管如此,每个同位素存在的数量仍可计算出来。如果没有适当的双通道的闪烁计数器的话,可以使用盖

格-弥勒(Geiger-Muller)计数器。在这情况下,适当厚度的滤纸或薄铝片(置于样品与检测器之间)可用于区别能量水平。

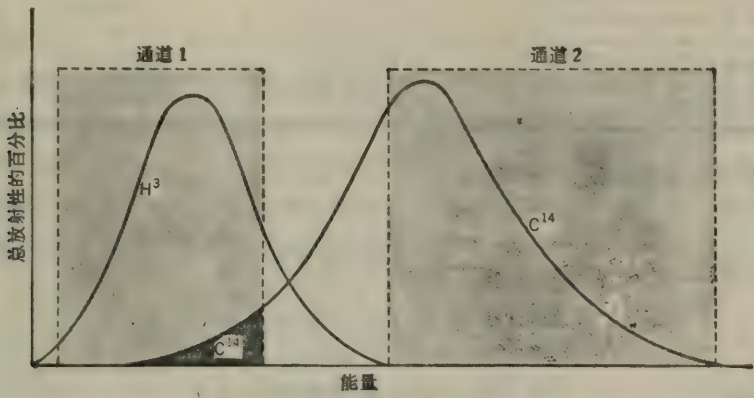


图 6-3 ^3H 和 ^{14}C 的能量分布波谱。将复式通道闪烁计数器的鉴别器调整到如图所示,通道 1 记录大部分 ^3H (和一点 ^{14}C), 而通道 2 只记录 ^{14}C 。

例题 6-19

某标记 RNA 样品, 内含 ^{14}C -腺嘌呤和 ^3H -尿嘧啶, 使用复式通道闪烁计数器测定时, 在通道 1 产生 25,000 CPM, 在通道 2 产生 45,000 CPM。含 40,000 DPM (或在最适的计数条件下的 40,000 CPM) 的标准 ^{14}C 在通道 1 产生 10,000 CPM, 在通道 2 产生 20,000 CPM。含 200,000 DPM (或 200,000 CPM 在最适计数条件下) 的标准 ^3H 在通道 1 产生 40,000 CPM, 在通道 2 产生 100 CPM。所有的计数都做过本底方面的校正。计算该 RNA 样品中 ^3H DPM 和 ^{14}C DPM?

解:

我们从标准物看到在通道 2 基本上所有的计数来自 ^{14}C , 但只记录了 ^{14}C DPM 的一半 (略去了 ^3H 给通道 2 的一小部分)。因此样品在通道 2 的 45,000 CPM 相当于

$$\frac{45,000}{0.5} = 90,000 \text{ DPM } ^{14}\text{C}$$

通道 1 记录的 25,000 CPM, 代表了 25% 的 ^{14}C DPM 加上 20% 的 ^3H DPM。

$$(0.25)(90,000) + (0.20)(^3\text{H DPM}) = 25,000$$

$$^3\text{H} = \frac{(25,000) - (0.25)(90,000)}{0.2} = \frac{2500}{0.2}$$

$$^3\text{H} = 1250 \text{ DPM}$$

例题 6-20

某水藻生长在合成培养基里。培养基含 $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ (2.9×10^6 DPM/微摩尔) 和 ^{32}P (5.2×10^6 DPM/微摩尔), 分别为硫和磷的唯一来源。用纸层析法将该有机体的无细胞脱蛋白质抽提物进行分析。从层析谱上将所得的含 ^{35}S 和 ^{32}P 的放射性斑点洗脱下来。并在复式通道闪烁计数器内计数。 ^{35}S 和 ^{32}P 标准也同样计数。数据表示如下:

添 加 的	观察到的(做过本底方面的校正)	
	通道 1	通道 2
标准 ^{32}P (58,000 DPM)	39,000 CPM	14,000 CPM
标准 ^{35}S (110,000 DPM)	18,000 CPM	56,000 CPM
洗脱的样品	74,600 CPM	38,500 CPM

计算在未知化合物中的 P/S 比例。

解:

$$\text{通道 1 计数: } \frac{39,000}{58,000} = 67.2\%, \text{ } ^{32}\text{P DPM 的}$$

$$\text{和 } \frac{18,000}{110,000} = 16.4\%, \text{ } ^{35}\text{S DPM 的}$$

$$\text{通道 2 计数: } \frac{14,000}{58,000} = 24.1\%, \text{ } ^{32}\text{P DPM 的}$$

$$\text{和 } \frac{56,000}{110,000} = 50.9\%, \text{ } ^{35}\text{S DPM 的}$$

两个通道中没有哪一个通道只代表了一种同位素的 CPM。因此,为了求解 ^{32}P DPM 和 ^{35}S DPM,我们必须列出二个联立方程式:

$$\text{通道 1: } (0.672)(^{32}\text{P}) + (0.164)(^{35}\text{S}) = 74,600$$

$$\text{通道 2: } (0.241)(^{32}\text{P}) + (0.509)(^{35}\text{S}) = 38,500$$

用通道 1 方程式,将 ^{32}P 用 ^{35}S 来求解:

$$^{32}\text{P} = \frac{(74,600) - (0.164)(^{35}\text{S})}{(0.672)}$$

将上述 ^{32}P 的关系式代入通道 2 方程式中:

$$(0.241)\left(\frac{(74,600) - (0.164)(^{35}\text{S})}{0.672}\right) + 0.509(^{35}\text{S}) = 38,500$$

$$\frac{(0.241)(74,600)}{0.672} - \frac{(0.241)(0.164)(^{35}\text{S})}{0.672} + 0.509(^{35}\text{S}) = 38,500$$

$$26,753 - 0.059(^{35}\text{S}) + 0.509(^{35}\text{S}) = 38,500$$

$$0.45(^{35}\text{S}) = 11,747$$

$$(^{35}\text{S}) = 26,104 \text{ DPM}$$

其次,从通道 1 或通道 2 方程式中计算 ^{32}P 。

$$(0.672)(^{32}\text{P}) + (0.164)(26,104) = 74,600$$

$$^{32}\text{P} = \frac{(74,600) - (0.164)(26,104)}{0.672} = \frac{70,318}{0.672}$$

$$(^{32}\text{P}) = 104,641 \text{ DPM}$$

样品中每个同位素的数量:

$$^{32}\text{P} = \frac{104,641 \text{ DPM}}{5.2 \times 10^6 \text{ DPM/微摩尔}} = 0.02 \text{ 微摩尔}$$

$$^{35}\text{S} = \frac{26,104 \text{ DPM}}{2.9 \times 10^6 \text{ DPM/微摩尔}} = 0.009 \text{ 微摩尔}$$

或

$$\text{P/S} \approx 2$$

E. 生物的半衰期——转换

有效的半衰期

当把短衰期的放射性同位素引进生物系统时，所观察到的放射性衰变是来自正常的放射性衰变和生物转换的组合(例如：通过分泌或转运将血流中的同位素移进组织)。如果生物转换是一级过程，那么 $\lambda_{\text{表}}$ ，一级表观速率常数为 λ_r (放射性的) $+\lambda_b$ (生物的)之和。这是完全可以理解的，因为 λ 代表了存在的活性每时间小增量所消失的部分。消失的部分可以相加。在任意时间所观察到的放射性由下式给出：

$$2.3 \log \frac{N_0}{N} = \lambda_{\text{表}} t = (\lambda_r + \lambda_b) t$$

有效半衰期(当 $N_0/N=1:0.5=2$)由下式给出：

$$\frac{0.693}{(\lambda_r + \lambda_b)} = t_{\frac{1}{2}(\text{有效})} \quad (8)$$

或

$$\frac{1}{t_{\frac{1}{2}(\text{有效})}} = \frac{\lambda_r + \lambda_b}{0.693} = \frac{\lambda_r}{0.693} + \frac{\lambda_b}{0.693}$$

$$\frac{1}{t_{\frac{1}{2}(\text{有效})}} = \frac{1}{t_{\frac{1}{2}r}} + \frac{1}{t_{\frac{1}{2}b}} \quad (9)$$

或

$$t_{\frac{1}{2}(\text{有效})} = \frac{(t_{\frac{1}{2}r})(t_{\frac{1}{2}b})}{t_{\frac{1}{2}r} + t_{\frac{1}{2}b}} \quad (10)$$

例题 6-21

对一只豚鼠，只单次注射了 $^{24}\text{NaCl}$ 。定时地取出血样并立即分析放射性。数据表示如下。计算(a)血流中 ^{24}Na 的生物半衰期，(b)1小时样品的比活性(CPM/毫升)。设所有样品都是在24小时内计数的。 ^{24}Na 的放射性半衰期是15小时。

注射后时间(小时)	比活性(CPM/毫升)	注射后时间(小时)	比活性(CPM/毫升)
1	3604	10	1412
3	2928	16	756
5	2376	24	329

解：

(a) 首先从任意二个时间比活性中计算有效半衰期，例如，3和10小时：

$$2.3 \log \frac{2928}{1412} = \frac{0.693}{t_{\frac{1}{2}(\text{有效})}} \quad (7)$$

$$t_{\frac{1}{2}(\text{有效})} = \frac{(0.693)(7)}{2.3 \log 2.074} = \frac{4.851}{(2.3)(0.3167)}$$

$$t_{\frac{1}{2}(\text{有效})} = 6.66 \text{ 小时}$$

现在可计算 $t_{\frac{1}{2}b}$ ：

$$\frac{1}{t_{\frac{1}{2}(\text{有效})}} = \frac{1}{t_{\frac{1}{2}r}} + \frac{1}{t_{\frac{1}{2}b}} \quad \frac{1}{t_{\frac{1}{2}b}} = \frac{1}{t_{\frac{1}{2}(\text{有效})}} - \frac{1}{t_{\frac{1}{2}r}}$$

$$\frac{1}{t_{\frac{1}{2}b}} = \frac{1}{6.66} - \frac{1}{15} = 0.150 - 0.0667 = 0.0833$$

$$t_{\frac{1}{2}b} = \frac{1}{0.0833} \quad t_{\frac{1}{2}b} = 12 \text{ 小时}$$

(b) 在 24 小时, 所有样品的放射性衰变因数都是相同的. 每个样品比活性的减少只是反映了 ^{24}Na 以 12 小时的半衰期从血液中移走的速率. 24 小时样品将计数为 329 CPM/毫升, 计算一小时样品的比活性如下所示:

$$2.3 \log \frac{N_0}{329} = \frac{0.693}{12} (23)$$

$$\log N_0 - \log 329 = \frac{(0.693)(23)}{(12)(2.3)} = 0.5775$$

$$\log N_0 = 0.5775 + \log 329 = 3.0946$$

$$N_0 = 1243 \text{ CPM/毫升}$$

转换

细胞的许多成分都处于动态中, 从而它们的合成和降解是在恒定的转换速率下进行的, 而它们的总浓度保持不变. 如果能够标记具体的成分, 就能测量转换速率.

例题 6-22

将大肠杆菌培养在含有 ^{32}P 为磷唯一来源的合成培养基中. 生长几代以后, 采收细胞、洗涤, 并重新悬浮在含未标记的磷酸盐和缺少氮源的新鲜培养基中(因此不会继续生长). 定时地采收一部分静止细胞、洗涤, 并用氯仿-甲醇混合液抽提类脂物. 在硅胶板上用薄层层析法分离各个磷脂. 洗脱相当于磷脂酰甘油的斑点, 并用化学方法分析全部的磷和计数. 磷脂酰甘油的比活性表示如下. 所有样品是在各自间隔几分钟内完成计数的, 所以不需要校正 ^{32}P 的衰变.

重新悬浮后的时间(时)	磷酸酰甘油的比活性 (CPM/微摩尔)	重新悬浮后的时间(时)	磷酸酰甘油的比活性 (CPM/微摩尔)
0	40,000	2.5	9,987
0.5	30,306	3.0	7,567
1.0	22,962	5.0	2,494
2.0	13,181		

计算磷酸酰甘油在大肠杆菌中的转换速率(k 和 $t_{1/2}$).

解:

从记录的数据中, 我们能估算出 $t_{1/2}$ 处于 1 和 1.5 小时之间的某处(0 与 1 小时时间移走了少于 ^{32}P 的一半; 0.5 与 2.0 小时之间移走了 ^{32}P 存在于 0.5 时的多一半). 可标绘出比活性对数对时间的线图, 并从图的斜率(斜率 = $-k/2.3$), 测定出一级速率常数, k . 另一方法是, 我们可从任两点(例如, 1 和 2.5 小时)中计算 k :

$$2.3 \log \frac{22,962}{9987} = k(90 \text{ 分})$$

$$k = \frac{2.3}{90} \log 2.299 = (0.0256)$$

$$k = 9.24 \times 10^{-3} \text{ 分}^{-1}$$

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k} = \frac{0.693}{9.24 \times 10^{-3}}$$

$$t_{1/2} = 75 \text{ 分}$$

前体-产物的关系

同位素的示踪物已经极为有效地用于说明代谢途径的问题。建立前体-产物关系(即

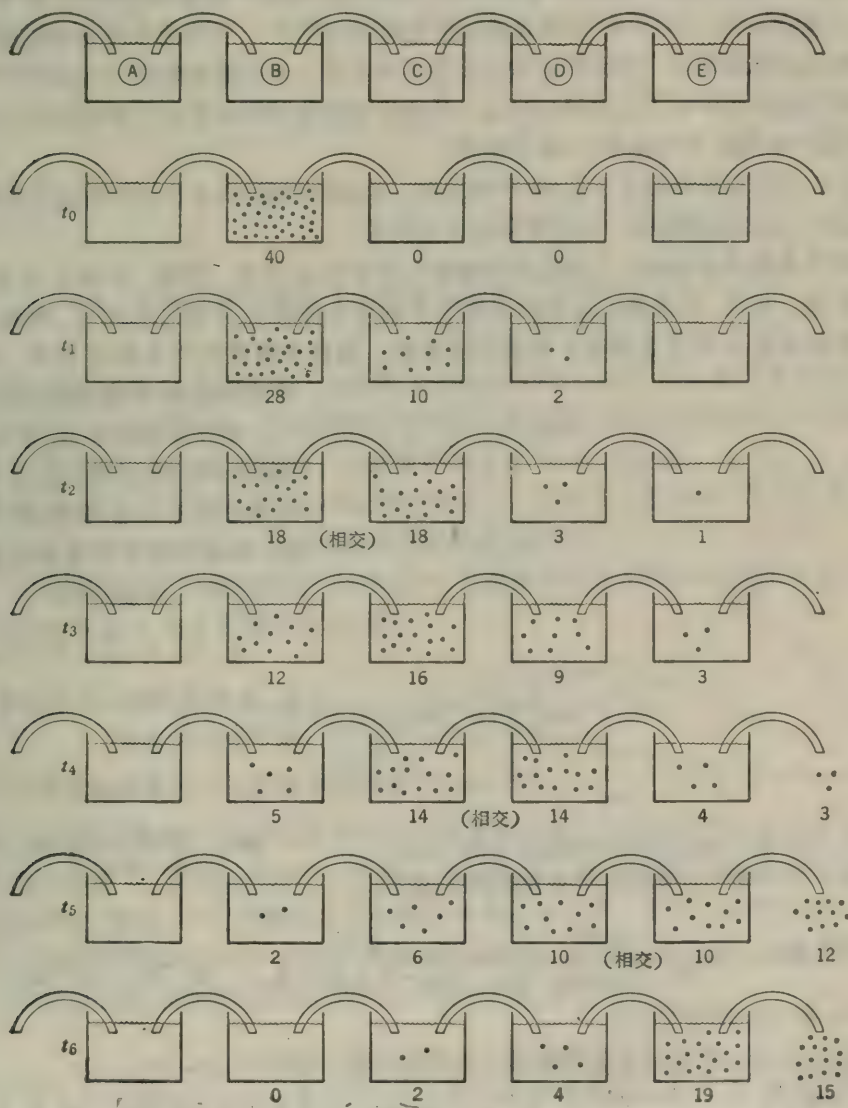
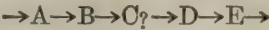


图 6-4 前体-产物关系在 $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow E$ 等途径中。圆点代表了放射性标记分子。由于所示储库的容量都是相等的(为简化起见)圆点的数目也代表了中间产物的比活性。例如,如果 C 库比 B 库大二倍,当 $S.A._C = S.A._B$ 时, C 库中圆点的数目就应该比 B 库大二倍。前体-产物关系可安排在实验室示范,用染料代替放射性。溶液的吸光率可比拟为比活性。

反应序列)的做法是:将微量高度标记猜测的前体引进系统,然后在中间产物和最后产物中跟踪标记的出现.标记前体的质量应极小,因而各种中间产物的代谢库稳态量度不变.例如,考虑下示的序列,其中我们猜测 C 是在自 A 到 D 途径的中间产物.



在零时,用注射或喂以有机体极小量的高比活性 B*,使 B 成为放射性的.假如 C 果真是 B 和 D 间的中间产物,我们将观察到什么?我们观察到 B 的比活性立即上升,继之以一级方式衰变,即标记的 B 转化为 C,而未标记的 A 转化为 B. B 的总代谢库保持不变,因为每摩尔的 B 转化为 C 时,就有一摩尔 A 转化为 B. 同样地,在这个稳态条件下 C, D, E 等等的总代谢库保持不变. 只有 B, C 等等的放射性随时间变化. 当标记分子进入代谢库时,中间产物的比活性就增高. 中间产物的比活性不受其进一步代谢的影响(标记的和未标记的分子在恒定的比例下离开代谢库). 当进入代谢库的前体的比活性低于库内中间产物的比活性时,中间产物的比活性就减小(通过稀释).

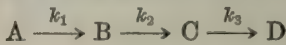
图 6-4 用比拟图解表示了前体-产物关系. 为简化起见,所有代谢库的量度都假定是相同的,但并不必须是真实的. 由此可得出几点结论:

如果 C 是由 B 制成的, C 的比活性增量永不会超过 B 的. 同样, D 的比活性也永不会大于 C 的. 因而, C 的最大比活性出现于 C 的比活性等于 B 的比活性时. 同样, D 的最大比活性出现于 D 的比活性等于 C 的比活性时. 这些观察建立了 B 和 C 之间,以及 C 和

D 之间前体-产物的直接关系.

图 6-5 表示了 B, C 和 D 的比活性为时间的函数. 注意 B 曲线的交点出现于 C 曲线的最大值. 同样, C 曲线交于 D 曲线的最大值.

对于不可逆序列



A, B 和 C(CPM)的放射性数量可由下列公式表示:

$$A^* = A_0^* e^{-k_1 t} \tag{11}$$

$$B^* = \frac{k_1 A_0^*}{(k_2 - k_1)} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \tag{12}$$

$$C^* = k_1 k_2 A_0^* \left(\frac{e^{-k_1 t}}{(k_2 - k_1)(k_3 - k_1)} + \frac{e^{-k_2 t}}{(k_1 - k_2)(k_3 - k_2)} + \frac{e^{-k_3 t}}{(k_1 - k_3)(k_2 - k_3)} \right) \tag{13}$$

式中, $A_0^* = A$ 内的原始 CPM,

$k_1, k_2, k_3 = A, B$ 和 C 的生物转换一级速度常数(也表示为 $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$).

在任意时间 A, B 和 C 的比活性等于存在的 CPM 除以小库中微摩尔的总数目. 该同位素的半衰期是假定为相对地比 A, B, C 等的生物半衰期长. n 个中间产物的通式,可用适当的数学方法导出[例如,参阅 O. Cappellos and B. H. J. Bielski, *Kinetic Systems*, Ch. 9, Wiley-Interscience(1972)].

例题 6-23

在绿化大麦的叶子中，研究了 δ -氨基乙酰丙酸(ALA，叶绿素前体)的生物合成。初步的长期试验指出 ALA 表现的放射性是来自甘氨酸-2- ^{14}C (α -碳标记)和谷氨酸-2, 3- ^{14}C (亚甲基碳标记)。更详细的研究得出的比活性数据表示在图 6-6 中。你能得出什么结论?

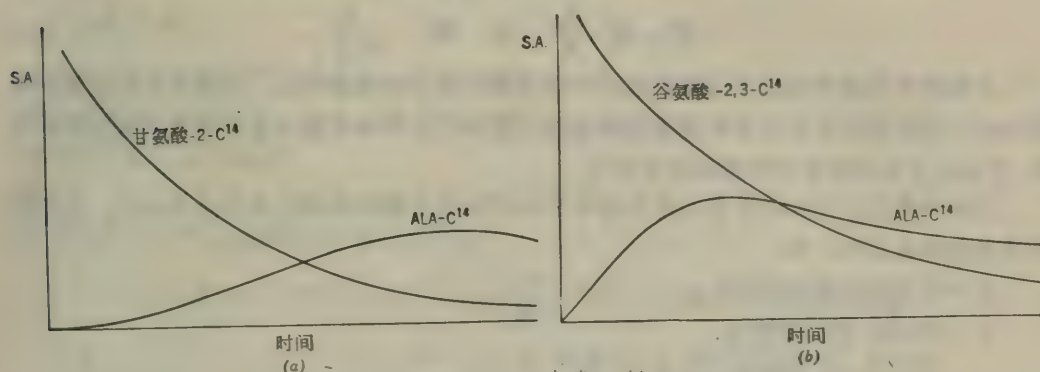


图 6-6 δ -氨基乙酰丙酸和两个可能的前体(a)甘氨酸-2- ^{14}C 和(b)谷氨酸-2, 3- ^{14}C 。

解:

(a) 甘氨酸不是 ALA 的直接前体。原始存在于甘氨酸- ^{14}C 中的 ^{14}C ，最后是出现在 ALA 中，但这并不是没有想到的事。甘氨酸毕竟会转化为丝氨酸，并且丝氨酸转化为丙酮酸。大多数化合物产生来自丙酮酸，其中的一个或多个可能是 ALA 的前体。

(b) 两曲线的相交点出现在 ALA 最高比活性的附近。因此，谷氨酸是 ALA 的直接前体，或谷氨酸转化为半衰期很短，而且储量量度很小的直接前体。

注：这些结果提出了植物体内发生的 ALA 合成途径完全不同于动物体内的(其中甘氨酸与琥珀酰-S-CoA 缩合直接形成 ALA)。

F. 放射性示踪物与稀释分析法

测定未标记化合物的含量——同位素稀释法

放射性示踪物可应用于测定混合物中单个物质的数量。在所研究的物质定量回收有困难或不可能的情况下，示踪物技术尤其有用。该技术的内容就是将已知数量的放射性化合物加入混合物中，然后(充分均衡后)，再分离出少量的化合物。化合物的回收量并不重要，只要它足够量出和计数就行了。从再分离出的化合物的比活性以及知道了原来添加的计数总数目，就可以计算出混合物中非放射性化合物的数量，表示如下。

设:

A_0 = 添加示踪物的 CPM。示踪物的重量与混合物中非放射性化合物重量比是很小的。

M_u = 混合物中非放射性化合物的未知量。

$\therefore \frac{A_0}{M_u} = \text{S. A.}_u$ = 添加过示踪物后混合物中化合物的比活性。

M_r = 用示踪物均衡后从混合物中再分离出的纯化合物的数量。

A_r = 再分离的样品中的 CPM.

$\frac{A_r}{M_r} = S.A._r$ = 再分离的化合物的比活性.

显然, 放射性与质量的比值(化合物的比活性)在混合物中与分离后的是相同的.

$$S.A._u = S.A._r \quad \frac{A_o}{M_u} = \frac{A_r}{M_r}$$

$$\therefore M_u = M_r \frac{A_o}{A_r} \quad \text{或} \quad M_u = \frac{A_o}{S.A._r} \quad (14)$$

上述计算依据了添加的示踪物数量与混合物中化合物数量相比, 可略去不计的假设为前提的. 在实践中, 这个条件是容易满足的. 因为许多具有生物学意义的化合物凡是有用的, 都存在于比活性极高的放射性形式中.

如果放射性示踪物的数量与混合物中非放射性化合物数量相比是有意义的话, 这个方程式必须加以改正. 设:

A_o = 添加示踪物的 CPM.

M_o = 添加示踪物的数量.

$\therefore \frac{A_o}{M_o}$ = 添加示踪物的比活性 = $S.A._o$.

M_u = 混合物中非放射性化合物的未知量.

$\therefore \frac{A_o}{M_u + M_o}$ = 添加示踪物后混合物中化合物的比活性 = $S.A._u$.

M_r = 放射性化合物与非放射性化合物均衡后, 从混合物中再分离出的纯化合物数量.

A_r = 再分离样品的 CPM.

$\therefore \frac{A_r}{M_r}$ = 再分离的样品的比活性 = $S.A._r$.

和前面一样, 再分离的样品中化合物比活性与它过去在混合物中比活性是相同的.

$$S.A._u = S.A._r$$

$$\frac{A_o}{M_u + M_o} = \frac{A_r}{M_r}$$

$$A_r M_u + A_r M_o = A_o M_r$$

$$A_r M_u = A_o M_r - A_r M_o$$

$$M_u = \frac{A_o M_r - A_r M_o}{A_r} = \frac{A_o M_r}{A_r} - \frac{A_r M_o}{A_r}$$

$$M_u = M_r \frac{A_o}{A_r} - M_o \quad \text{或} \quad M_u = \frac{A_o}{S.A._r} - M_o \quad (15)$$

我们可看出, 当 M_o 与 M_u 相比是变小时, 该方程式就简化为方程式(14).

如果我们关心的只是比活性, 那么以下几点就是显而易见的: 第一, 再分离的化合物的比活性少于原始示踪物的比活性. 第二, 比活性降低的程度(即, 稀释因数)是直接关系到混合物中未标记化合物的数量. 换句话说, 比活性稀释度等于放射性示踪物的稀释度.

$$\text{稀释度} = \frac{S.A._r}{S.A._o} = \frac{M_o}{M_o + M_u}$$

$$S.A._r M_o + S.A._r M_u = S.A._o M_o$$

$$S.A._r M_u = S.A._o M_o - S.A._r M_o$$

$$M_u = \frac{S.A._o M_o - S.A._r M_o}{S.A._r}$$

$$M_u = \left(\frac{S.A._o - S.A._r}{S.A._r} \right) M_o = \left(\frac{S.A._o}{S.A._r} - 1 \right) M_o$$

$$M_u = \left(\frac{S.A._o}{S.A._r} - 1 \right) M_o \quad (16)$$

例题 6-24

无载体 $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ (5×10^8 CPM) 加入含未知量的未标记硫酸盐样品中。均衡后, 硫酸盐的小样品再分离为 $\text{Ba}^{35}\text{SO}_4$, 2 毫克 $\text{Ba}^{35}\text{SO}_4$ 的样品含 2.9×10^5 CPM。计算 M_u , 样品中未标记的 SO_4^{2-} 以 Na_2SO_4 表示。

解:

再分离的 $\text{Ba}^{35}\text{SO}_4$ 的比活性, $S.A._r$, 是:

$$S.A._r = S.A._{\text{Ba}^{35}\text{SO}_4} = \frac{2.9 \times 10^5 \text{ CPM}}{2 \text{ 毫克}} = 1.45 \times 10^5 \text{ CPM/毫克}$$

$$\text{或 } 1.45 \times 10^5 \text{ CPM/毫克} \times 233.5 \text{ 毫克/毫摩尔} = 3.39 \times 10^7 \text{ CPM/毫摩尔}$$

1 毫摩尔的 BaSO_4 含 1 毫摩尔的 SO_4^{2-} , 因此, SO_4^{2-} 的比活性也是 3.39×10^7 CPM/毫摩尔。现在我们能够计算样品中未标记 SO_4^{2-} 的数量。

$$M_u = \frac{A_o}{S.A._r}$$

式中, A_o = 添加的总放射性 = 5×10^8 CPM。

$$S.A._r = 3.39 \times 10^7 \text{ CPM/毫摩尔}.$$

$$M_u = \frac{5 \times 10^8 \text{ CPM}}{3.39 \times 10^7 \text{ CPM/毫摩尔}}$$

$$M_u = 14.74 \text{ 毫摩尔}$$

以 Na_2SO_4 表示:

$$M_u = 14.74 \text{ 毫摩尔} \times 142 \text{ 毫克/毫摩尔} = 2093 \text{ 毫克}$$

$$M_u = 2.09 \text{ 克}$$

例题 6-25

20 毫克的 C^{14} 标记的糖原 (6.7×10^4 CPM/毫克) 添加到含未知数量未标记糖原的溶液中。从中再分离出很小数量的糖原, 并用乙醇再沉淀, 到恒定的比活性 (2.8×10^4 CPM/毫克), 计算溶液中未标记糖原的数量。

解:

因为 $S.A._r$ 与 $S.A._o$ 是同级量值, 溶液中未标记糖原数量与添加标记物质的数量相比显然是有意义的, 我们必须用方程式 (16):

$$M_u = \left(\frac{S.A._o}{S.A._r} - 1 \right) M_o$$

$$M_u = \left(\frac{6.7 \times 10^4}{2.8 \times 10^4} - 1 \right) 20 \text{ 毫克} = (2.39 - 1) 20 = (1.39) (20)$$

$$M_u = 27.9 \text{ 毫克}$$

测定放射性化合物的含量——反向同位素稀释法

稀释分析法同样可用于测定混合物中放射性化合物的含量, 如果该化合物的比活性为已知。例如, 如某有机体生长在标记的 $^{14}\text{CO}_2$ 或标记均匀的葡萄糖- ^{14}O , 为唯一碳源条件下, 那么有机体中所有的碳化合物都具有和原始放射性碳源相同的比活性(CPM/微摩尔碳)。设:

M_u = 混合物中放射性化合物的未知数量。

A_u = 上述未知重量中的 CPM。

$\therefore \frac{A_u}{M_u}$ = 放射性化合物的比活性 = S.A._u。

M_o = 添加到混合物中非放射性化合物的数量。

$\frac{A_u}{M_u + M_o}$ = 添加非放射性示踪物后混合物中化合物的比活性 = S.A._o。

M_r = 放射性化合物与非放射性化合物均衡后, 从混合物中再分离出的化合物的数量。

A_r = 回收样品的 CPM。

$\therefore \frac{A_r}{M_r}$ = 回收化合物的比活性 = S.A._r。

S.A._r = S.A._o。

S.A._r = $\frac{A_u}{M_u + M_o}$

如果非放射性化合物的添加数量(载体)与混合物中放射性化合物数量相比是很大的话, 方程式可简化为

$$\text{S.A.}_r = \frac{A_u}{M_o} \quad A_u = \text{S.A.}_r M_o$$

根据定义:

$$\text{S.A.}_u = \frac{A_u}{M_u} \quad \therefore M_u = \frac{A_u}{\text{S.A.}_u}$$

代入:

$$M_u = \frac{\text{S.A.}_r}{\text{S.A.}_u} M_o \quad (17)$$

如果放射性化合物数量与添加的载体数量相比是有意义的话, 那么必须作适当的修正:

$$\text{S.A.}_r = \frac{A_u}{M_u + M_o}$$

$$\text{S.A.}_r M_u + \text{S.A.}_r M_o = A_u$$

$$A_u = \text{S.A.}_u M_u$$

$$\text{S.A.}_r M_u + \text{S.A.}_r M_o = \text{S.A.}_u M_u$$

$$\text{S.A.}_r M_u - \text{S.A.}_u M_u = -\text{S.A.}_r M_o$$

$$\text{S.A.}_u M_u - \text{S.A.}_r M_u = \text{S.A.}_r M_o$$

$$M_u [\text{S.A.}_u - \text{S.A.}_r] = \text{S.A.}_r M_o$$

$$M_u = \frac{\text{S.A.}_r}{\text{S.A.}_u - \text{S.A.}_r} M_o \quad (18)$$

例题 6-26

某植物生长在含 $^{14}\text{CO}_2$ (3×10^8 CPM/微摩尔) 的大气中。几个星期以后, 制备了叶子的抽提物, 使用反向同位素稀释分析法测定葡萄糖-1-磷酸。对 20 毫升抽提物添加 1.5 毫摩尔未标记二钾葡萄糖-1-磷酸。从抽提物中再分离出小量的二钾葡萄糖-1-磷酸, 并从含水乙醇中重新结晶至恒定的比活性。重新结晶出的盐比活性为 2.6×10^5 CPM/微摩尔。计算抽提物中标记葡萄糖-1-磷酸的浓度。

解:

该植物体中所有的碳化合物具有相同的比活性(以每摩尔碳为基础)。因都是由 $^{14}\text{CO}_2$ 提供的。每摩尔葡萄糖-1-磷酸中含 6 克原子的碳。

$\therefore \text{S.A.}_u = \text{葡萄糖-1-磷酸未知量的比活性} = 6 \times 3 \times 10^8 = 18 \times 10^8$ CPM/微摩尔

$$M_u = \frac{\text{S.A.}_r}{\text{S.A.}_u - \text{S.A.}_r} M_o$$

式中, M_o = 抽提物中添加非放射性载体的数量 = 1.5 毫摩尔。

$$M_u = \frac{2.6 \times 10^5}{1.8 \times 10^9 - 2.6 \times 10^5} 1.5 \text{ 毫摩尔}$$

2.6×10^5 与 1.8×10^9 相比是无意义的, 可自分母中略去。S.A._r 与 S.A._u 相比是这样小的事实直接表明了, 载体添加量与抽提物中放射性葡萄糖-1-磷酸数量相比是很大的。

$$M_u = \frac{2.6 \times 10^5}{1.8 \times 10^9} 1.5 = 2.167 \times 10^{-4} \text{ 毫摩尔}$$

$$M_u = 0.2167 \text{ 微摩尔}$$

$$\text{浓度} = \frac{0.2167 \text{ 微摩尔}}{20 \text{ 毫升}} = \frac{21.65 \times 10^{-2}}{20} = 1.084 \times 10^{-2} \text{ 微摩尔/毫升}$$

$$\text{浓度} = 1.084 \times 10^{-5} M$$

放射性衍生物分析法

如果能制备和分离出适用的放射性衍生物, 即使标记化合物不便得到时, 也可以测定混合物中未标记化合物的含量。将混合物与已知比活性的适用放射性试剂进行反应, 未标记化合物就可转化成具有相同比活性的衍生物。混合物中衍生物的数量可用前面概述的计算测定出来。

例题 6-27

氨基酸的某混合物与用 I^{131} 标记的对-碘苯磺酰氯化物进行反应, 以产生各个氨基酸的放射性对碘苯磺酰衍生物。对-碘苯磺酰氯化物的比活性是 4.23×10^5 CPM/微摩尔。反应后, 混合物中添加 250 毫克未标记亮氨酸的对-碘苯磺酰衍生物。再分离出小量的亮氨酸衍生物并提纯到恒定比活性为 1700 CPM/微摩尔。计算原来混合物中未标记亮氨酸的数量。

解:

在和对-碘苯磺酰氯化物反应后, 所有氨基酸的对碘苯磺酰衍生物具有相同的比活性 (4.23×10^5 CPM/微摩尔)。

$$M_u = \frac{S.A._r}{S.A._u - S.A._r}$$

$$M_o = \frac{17 \times 10^3}{4.23 \times 10^5 - 0.017 \times 10^5} 250 \text{ 毫克}$$

$$= \frac{17 \times 10^3}{4.21 \times 10^5} 250 = (4.04 \times 10^{-3}) (250) \text{ 毫克}$$

$$M_u = 1.01 \text{ 毫克}$$

测定酶分子量的亲和标记法

例题 6-28

准确称取 3.4 毫克纯化的蛋白水解酶(具有脂酶活性)用过量的二异丙基氟磷酸- ^{32}P (1 微居里/毫摩尔)处理, 24 小时后, 溶液中加进 KOH 以破坏未反应的(极有毒的)DF ^{32}P , ^{32}P -标记的酶用 TCA 沉淀后, 洗到不含溶解的 ^{32}P 为止, 然后再将其溶解于 0.5 毫升稀 KOH 中, 将 0.5 毫升的该溶液定量地转送到闪烁计数管中进行计数, 在计数效率为 80% 时, 测样的计数为每小时高出本底 7380。酶的最低分子重量是多少?

解:

DF ^{32}P 与丝氨酸残基在活性部位上起反应, 该酶的最低分子量即是含 1 摩尔的活性丝氨酸残基的分子量, ^{32}P 结合到酶的摩尔数目等于活性丝氨酸的摩尔数目(假设反应要进行到底)。

首先, 注意 24 小时后, ^{32}P 的比活性已经轻微地衰变:

$$2.3 \log \frac{S.A._o}{S.A._t} = \lambda t$$

$$\log 1 - \log S.A._t = \frac{(0.693)}{(14.3)(2.3)}$$

$$\log S.A._t = \log 1 - 0.0210$$

$$\log S.A._t = -0.0210$$

$$S.A._t = 0.953 \text{ 微居里/毫摩尔}$$

在给定计数效率时

$$S.A._t = (0.953 \text{ 微居里/毫摩尔}) (2.22 \times 10^6 \text{ CPM/微居里}) (0.80 \text{ CPM/DPM})$$

$$= 16.93 \times 10^5 \text{ CPM/毫摩尔} = 16.93 \times 10^8 \text{ CPM/摩尔}$$

标记酶含

$$\frac{7380}{60} = 123 \text{ CPM}^{32}\text{P}$$

$$\frac{123 \text{ CPM}}{16.93 \times 10^8 \text{ CPM/摩尔}} = 7.265 \times 10^{-8} \text{ 摩尔的 } ^{32}\text{P}.$$

用例题 2-11 中概述的步骤

$$\frac{7.265 \times 10^{-8} \text{ 摩尔的 } ^{32}\text{P}}{3.4 \times 10^{-3} \text{ 克}} = \frac{1 \text{ 摩尔的 } ^{32}\text{P}}{MW_x}$$

$$MW = \frac{3.4 \times 10^{-3}}{7.265 \times 10^{-9}}$$

$$MW = 46,800$$

G. 计数中的误差

自体吸收

当放射性样品放在小圆盘上计数时, 有些射线被样品本身吸收掉, 因而达不到计数管。为避免由自吸收造成的误差, 最好的办法是在恒定的密度(物质毫克/厘米²)下对所有的样品计数(包括标准物)。如果样品是在溶液中, 就可掺入一些惰性物质(例如, 凝胶的稀溶液), 以便干燥后, 每个圆盘容纳了同样数量的总质量。质量中的小变化(由先称空盘重量后称干燥的样品+凝胶的重量中找出)可用自体吸收曲线加以校正。该曲线是在含有不同数量的惰性稀释剂的圆盘上对恒量的放射性样品进行计数后绘制成的。图 6-7 表示了校正曲线, 其中取 10 毫克/圆盘为标准密度。校正任一其他密度的计数率可用观察到的计数率除以自体吸收因数。惰性稀释剂应具有和样品中物质相同自体吸收特性。因此, 凝胶对于有机化合物的溶液来说是合适的稀释剂, 同样, 凝胶加 NaCl 对含盐样品, 未标记的 BaCO₃ 对 Ba¹⁴CO₃ 等等都是如此。

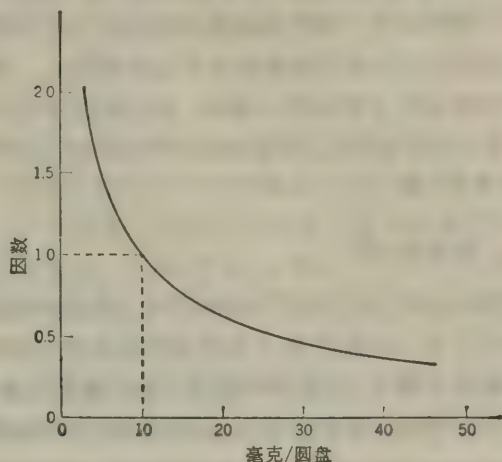


图 6-7 自体吸收校正曲线, 取 10 毫克/圆盘为标准密度。

如果有充足的材料可用的话, 则样品可在无限厚度的情况下计数。所谓无限厚的样品就是圆盘内添加了更多的样品时, 并不增加计数率。在无限厚度时, 样品底层的射线完全被样品吸收了, 达到计数管的射线, 仅仅是自样品表层, 例如 1.2 毫米处发出的。添加更多样

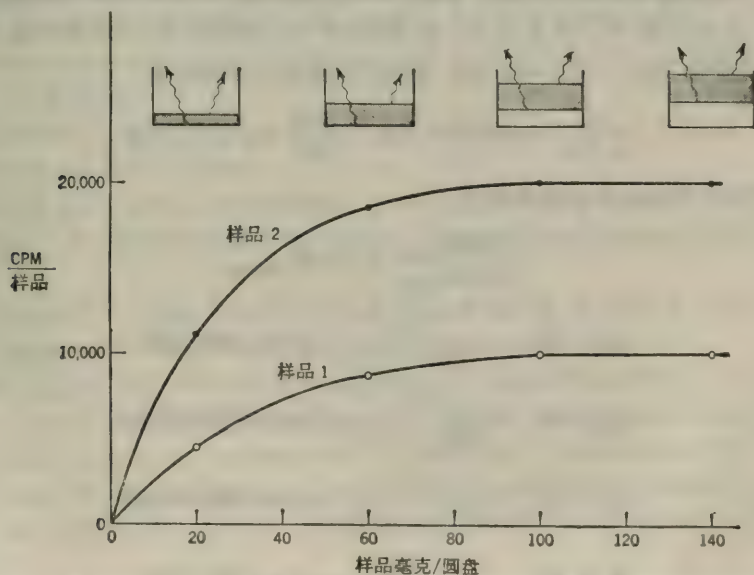


图 6-8 CPM/样品对圆盘样品数量(即样品厚度)作图说明在无限厚度下观察到的恒定活性。

品不会增加计数率的原因是,即使计数管下标记样品量再大,也只能探测到离样品表层 1.2 毫米处发射的射线。因此,在无限厚度下观察到的计数率和样品的比活性是成正比的。图 6-8 说明了上述情况,其中样品 2 的比活性是样品 1 的二倍。

闪烁计数中的猝灭

测样中有了惰性物质或有色物质就可能降低闪烁计数观察到的放射性。这个猝灭效应应用内在或添加标准物能够十分容易地校正。首先,必须确定样品的计算和标准物的计算是在相同条件下进行的。例如,如果样品为 0.5 毫升的酶试验混合物(在缓冲溶液中)添加到 5 毫升闪烁液体里,那么测定标准物的比活性也应当用 0.5 毫升相同的缓冲剂在 5 毫升闪烁液中计数。

例题 6-29

某柱洗脱物用于分析 ³H-环 AMP。每组分中精确地取出 0.2 毫升,置于 0.5 毫升闪烁液中进行计数。该柱是 KCl 线性梯度洗脱液洗脱的,因此每组分中的盐浓度是不恒定的。为了校正猝灭现象,在测样计数后,每闪烁管中加进 10 微升的 ³H-环 AMP。结果表示如下。计算每个测样中未猝灭的 ³H 的活性,空白是 0.2 毫升水。

样 品	高出本底的 CPM		样 品	高出本底的 CPM	
	单独样品	样品+添加的 ³ H-环 AMP		单独样品	样品+添加的 ³ H-环 AMP
空 白	5	1786	组分 80	5250	6630
组分 50	9	1610	组分 82	1589	2829
组分 75	115	1575	组分 85	125	1285

解:

如果我们取该空白值为我们的标准,于是,10 微升添加的 ³H-环 AMP 的计数为高出本底 1781 CPM。在组分 50 中,10 微升 ³H-环 AMP 产生了 1610-9=1601 CPM。因此,只回收了添加标记物的 1601/1781=89.9%,组分 50 的校正计数率是

$$\frac{9}{0.899}=10\text{ CPM} \quad \text{或} \quad \frac{1781}{1601}\times 9=10\text{ CPM}$$

同样,经过校正的其它组分计数率如下:

$$\frac{(\text{CPM})_{\text{添加的}}}{(\text{CPM})_{\text{恢复的}}}\times (\text{CPM})_{\text{单独样品}}$$

$$\text{组分 75: } \frac{1781}{1575-115}\times 115=140\text{ CPM}$$

$$\text{组分 80: } \frac{1781}{6630-5250}\times 5250=6775\text{ CPM}$$

$$\text{组分 82: } \frac{1781}{2829-1589}\times 1589=2282\text{ CPM}$$

$$\text{组分 85: } \frac{1781}{1285-125}\times 125=191\text{ CPM}$$

II. 稳定的同位素

没有放射性的同位素称作“稳定性同位素”。如果,某个别的同位素所含中子数目比该元素最常见形态所含的要多的话,该同位素常常看作是“重同位素”。在生物化学研究中常用的稳定性同位素,包括: ^2H (氘), ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{34}S , ^{44}Ca , ^{54}Fe , ^{57}Fe , ^{66}Zn 和 ^{68}Zn 。

过剩原子百分比

放射性化合物的标记程度是以其比活性为单位给定的(CPM/微摩尔,毫居里/毫摩尔等等)。用稳定性同位素标记化合物的程度是以“过剩原子百分比”表示的。这个名词代表了稳定性同位素的比例超过了自然界正常存在的数量。例如,假定 P_n 是在自然界中已知同位素的正常丰度(%), P_e 是在标记(附记后的)化合物中的丰度(%),于是 $P_e - P_n$ 就是过剩原子百分比(APE)。

稳定性同位素可用于酶的测定,前体-产物的测定,以及载体稀释分析法方面。使用时大体上和放射性示踪物一样。计算时是以每摩尔过剩原子百分比为基础代替了放射比活性。

一般参考文献

Hendee, W. R., *Radioactive Isotopes in Biological Research*. Wiley (1973)。

练习 题

答案见第 312—313 页

1. 写出核反应,表示 β 辐射如何影响 (a) ^{45}Ca , (b) ^{36}Cl , (c) ^{42}K 和 (d) ^{32}P 的衰变。
2. 某同位素半衰期为 4 年。计算 (a) 衰变常数 λ , 以年 $^{-1}$, 天 $^{-1}$, 时 $^{-1}$, 分 $^{-1}$, 秒 $^{-1}$ 表示, 和 (b) 13 月以后原始活性保持下来的分数。
3. ^{131}I 的半衰期为 8.1 天。计算: (a) 每天和每分钟 ^{131}I 原子衰变的分数, 和 (b) 纯 ^{131}I 的比活性以居里/克, 居里/克原子和 DPM/克为单位。
4. 某炼油厂附近小河中的一份有机物质取样, 其 ^{14}C 含量水平可给出的计数为 10 DPM/克碳。小河中总碳量有百分之几是来自该厂的污染? (注: 石油中该有机物质为数百万年前的, 基本上全部 ^{14}C 已衰变。)
5. (a) 制备果糖-1, 6-二磷酸- ^{32}P 时的理论上最大比活性(毫居里/毫摩尔)是多少? (b) 比活性为 2×10^6 DPM/微摩尔的 FD ^{32}P 样品中实际上标记的分子比例是多少?
6. 计算在 1 毫居里无载体 ^{45}Ca 中钙-45 的重量用克表示。钙的半衰期是 163 天。
7. 一瓶 3.5 毫升丝氨酸- ^{14}C (标记均匀的)溶液含 2.0 毫居里。给定比活性为 160 毫居里/毫摩尔, 计算 (a) 溶液中的丝氨酸浓度, 和 (b) 计数效率为 68% 时溶液的比活性, 以 CPM/毫升为单位。
8. 某 L-赖氨酸- ^{14}C (标记均匀的)溶液, 每毫升含 1.2 毫居里和 0.77 毫克 L-赖氨酸。计算赖氨酸的比活性, 以下列单位表示 (a) 毫居里/毫克, (b) 毫居里/毫摩尔, (c) DPM/微摩尔, 和 (d) 计数效率为 80% 时, CPM/微摩尔碳。
9. 叙述对 75 毫升, $10^{-2} M$ L-半胱氨酸- ^{35}S 氯化氢溶液, 其中氨基酸比活性为 3.92×10^4 DPM/微摩

尔的制备。假设已有未标记的 L-半胱氨酸氯化氢固体和 L-半胱氨酸-³⁵S 储备液(14 毫居里/毫摩尔和 1.2 毫居里/毫升)。

10. 叙述对 50 毫升, $10^{-3} M$ 葡萄糖-¹⁴C 溶液的制备。其中糖的比活性为 3000 DPM/微摩尔。假设你已有 $10^{-2} M$ 含有 0.02 微居里/毫升的储备液和葡萄糖固体。

11. 一份含 0.72 毫克蛋白质的粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)无细胞抽提物与邻-乙酰高丝氨酸, 以及标记甲基硫醇(¹⁴CH₃-SH, 比活性为 2.4×10^6 CPM/微摩尔)一同培育(总体积 1.5 毫升)。¹⁴C 是以 2240 CPM/分速率, 用酶促方式加进 L-蛋氨酸的。计算反应速率, 以下列单位表示: (a)微摩尔/分, (b)微摩尔 \times 升⁻¹ \times 分⁻¹ 和 (c)微摩尔 \times 蛋白毫克⁻¹ \times 分⁻¹。

12. 将含总放射性为 3×10^8 CPM 的 10 毫升 ⁵¹Cr-标记红血球细胞悬浮液, 注射进某试验对象体内。10 分钟后, 取血液小样, 经测定含有 5×10^4 CPM/毫升。计算该试验对象血液总体积。

13. 将取自淋巴肉瘤细胞的环 GMP 结合蛋白质纯化至同质性。该蛋白质可逆地结合到环 GMP 上。结合蛋白质的分子量为 60,000。将含 6 微克/毫升结合蛋白质溶液置于透析膜的一侧。膜的另一侧置放含有 ³H-环 GMP (S. A. = 10^9 CPM/微摩尔)溶液。透析槽的每个隔间体积为 0.1 毫升。平衡时, 在含蛋白质隔间的 10 微升溶液给出 2570 CPM; 在不含蛋白质隔间的 10 微升溶液给出 1870 CPM。计算[S], [PS], [P]_i, [P]和 K_s。

14. ¹⁴C-和 ³²P-标记 AMP 的某样品是以比活性为 9500 CPM/微摩尔制备成的(75% 活性来自 ³²P 的衰变, 25% 来自 ¹⁴C 衰变)。计算样品的比活性, 在(a)5 天后, (b)10 天后和(c)25 天后。

15. 用无窗的通气式圆盘计数器取得下列数据:

添 加 物	高出本底的 CPM	
	无 屏 蔽	有 铝 制 屏 蔽
¹⁴ C 标准品 250,000 DPM	75,000	12,520
³² P 标准品 125,000 DPM	80,000	50,000
样品	217,000	113,900

计算样品中 ¹⁴C 和 ³²P 的真实 DPM。

16. 将小量 ⁶⁴Cu ($t_{1/2}=12.8$ 时)注射进某动物血流中。定时取血样, 并立即计数。测样比活性表示如下。(a)从数据中, 计算血流中同位素的有效半衰期和生物的半衰期。(b)零时的 S. A. (CPM/毫升)是多少?

取样时间(小时)	比活性(CPM/毫升)	取样时间(小时)	比活性(CPM/毫升)
2	7120	10	1830
4	5070	18	470
6	3610		

17. 含 0.5 毫克 D-甘露糖-¹⁴C(标记均匀的, 比活性为 3.3×10^6 CPM/微摩尔)加进 50 毫升含未知量的未标记甘露糖溶液中。混合后, 再分离出 D-甘露糖为脲。该脲比活性为 14,280 CPM/微摩尔。计算原始溶液中未标记 D-甘露糖浓度。

18. 将 56 微克 ⁶⁰Co-标记维生素 B₁₂, 含有 7.39×10^5 CPM, 加进含有未知量的未标记维生素 B₁₂ 样品中。然后抽提该样品, 并用层析法提纯维生素 B₁₂。最后产品含 49 微克维生素 B₁₂ 和 1.58×10^5 CPM 放射性。计算样品中未标记维生素 B₁₂ 的数量。

19. 某酵母培养物生长在含 ³⁵SO₄²⁻(比活性为 4.78×10^7 CPM/微摩尔)为硫源的合成培养基里。生长几天后, 采收细胞并加以抽提。将 500 毫克未标记的还原谷胱甘肽加进 50 毫升抽提液中。于是, 从混合物中再分离出谷胱甘肽。再分离的化合物比活性为 6.97×10^6 CPM/微摩尔。计算抽提液中谷胱甘肽的浓度。

20. 用 ^{14}C -标记重氮甲烷(比活性为 1.93×10^6 CPM/微摩尔)处理脂肪酸混合物,以产生现存每种脂肪酸的甲基- ^{14}C -标记酯。然后将未标记甲基硬脂酸盐(2 毫摩尔)加进混合物。从混合物中再分离出的少量甲基硬脂酸盐经测定其比活性为 4.87×10^3 CPM/微摩尔。计算混合物里的硬脂酸的含量。

21. 称量精确为 1.7 毫克的纯化酶($\text{MW} = 55,000$)和超量的碘乙酰胺- ^{14}C 共同保温($\text{S.A.} = 2$ 微居里/毫摩尔)。然后将羧甲基化的蛋白质沉淀出来,将其洗涤直到不含未反应的碘乙酰胺- ^{14}C 后,溶于少量缓冲液中,并置整个溶液在操作效率为 80% 的闪烁计数器中计数。在一小时内,测样的计数为高出本底 13,190。计算每分子蛋白质的反应性 SH 基数目。

22. 用跟踪将 $^{32}\text{P}_i$ 中的 ^{32}P 加进 ATP 的方法测定 ADPG 磷酸化酶(ADPG 合成酶): $\text{ADPG} + \text{P}^{32}\text{P}_i \rightleftharpoons \text{G-1-P} + \text{AT}^{32}\text{P}$ 。所形成的 AT^{32}P 吸附进木炭,将其洗涤直到不含吸留的 P^{32}P_i 为止,然后重新悬浮在 1.0 毫升含水甲醇- NH_3 溶液中,并取 0.5 毫升在闪烁计数器中计数。测样为高出本底 21,550 CPM。为了检验猝灭作用,将 10,000 CPM 的 P^{32}P_i (早在没有木炭时的计数)加到样品中。该样品+添加的 P^{32}P_i 现计数为高出本底 28,270 CPM。(a)样品的真实(未猝灭的)活性是多少?(b)怎样做才不需要校正猝灭?

(王继孝译 董振芳、吴经才校)

附录

I 商用酸和碱浓溶液的性质

化 合 物	分 子 量	比 重	百 分 数 重量/重量	克/100 毫升	近似的当量	1 升 1 当量溶液 所需毫升数
HCl	36.5	1.19	37	44	12.1	82.5
HNO ₃	63.0	1.42	70	91	15.8	63.5
H ₂ SO ₄	98.1	1.84	96	173	35.2	29
H ₃ PO ₄	98.0	1.71	85	146	44.5	22.5
HClO ₄	100.5	1.66	70	116.2	11.6	86.5
HCOOH	46.0	1.20	88	105.6	24	41.6
CH ₃ COOH	60.0	1.06	100	106	17.4	57.5
NH ₃	17.0	0.91	28	22.8	14.8	67.5

II 用固体硫酸铵分级

硫酸铵的最终浓度, 0°C 时的饱和 %

	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
固 体 硫 酸 铵 添 加 到 100 毫 升 溶 液 中																	
0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2
10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7
15	2.6	5.4	8.2	11.1	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2
20	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
25		0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2
30			0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8
35				0	2.8	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.4	29.1	32.9	36.9	41.0	45.3
40					0	2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	25.8	29.6	33.5	37.6	41.8
45						0	2.9	5.9	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3
50							0	3.0	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.0	26.8	30.8	34.8
55								0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.5	27.3	31.3
60									0	3.1	6.2	9.5	12.9	16.4	20.1	23.9	27.9
65										0	3.1	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5	24.4
70											0	3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	20.9
75												0	3.2	6.6	10.1	13.7	17.4
80													0	3.3	6.7	10.3	13.9
85														0	3.4	6.8	10.5
90															0	3.4	7.0
95																0	3.5
100																	0

经 Oxford University Press(Oxford) 同意, 复制自 R. M. C. Dawson, D. C. Elliott 和 K. M. Jones 编辑的 *Data for Biochemical Research*, 第二版. © Oxford University Press(1969). 参见 *Methods in Enzymology*. Vol. 1, p. 76(1955) 为 25°C 时 制备的类似表格.

注: 溶液的 pH 值可能在添加硫酸铵时显著下降.

III 用饱和硫酸铵溶液分级

下列表格给出 1 升溶液中应添加饱和硫酸铵溶液毫升数,用以生成所需的饱和百分数。混合时体积的变化可略去不计。饱和硫酸铵溶液的 pH 大约为 5.5。加入几滴浓 NH_4OH 可将 pH 调至 7。

硫酸铵制备中的初始浓度(饱和百分数)

	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85
5	52.6																	
10	111	55.8																
15	177	118	58.8															
20	250	188	125	62.5														
25	333	267	200	133	66.7													
30	429	357	286	214	143	71.4												
35	559	462	385	308	231	154	76.9											
40	667	583	500	417	333	250	167	83.3										
45	818	727	637	546	455	364	273	182	91.0									
50	1000	900	800	700	600	500	400	300	200	100								
55	1222	1111	1000	889	778	667	556	444	333	222	111							
60	1500	1375	1250	1125	1000	875	750	625	500	375	250	125						
65	1857	1714	1571	1429	1286	1143	1000	857	714	571	429	286	143					
70	2333	2167	2001	1833	1667	1500	1333	1167	1000	833	667	500	333	167				
75	3000	2800	2600	2400	2200	2000	1800	1600	1400	1200	1000	800	600	400	200			
80	4000	3750	3500	3250	3000	2750	2500	2250	2000	1750	1500	1250	1000	750	500	250		
85	5667	5333	5000	4667	4333	4000	3667	3333	3000	2667	2333	2000	1667	1333	1000	667	333	
90	9000	8500	8000	7500	7000	6500	6000	5500	5000	4500	4000	3500	3000	2500	2000	1500	1000	500

不同温度时的饱和硫酸铵溶液

温 度 (°C)	0	10	20	25	30
每 1000 克 H_2O 中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的摩尔数	5.35	5.53	5.73	5.82	5.91
重量百分数	41.42	42.22	43.09	43.47	43.85
饱和 1000 毫升 H_2O 所需的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的克数	706.8	730.5	755.8	766.8	777.5
每升饱和溶液的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 克数	514.8	525.2	536.5	541.2	545.9
饱和溶液的容模	3.90	3.97	4.06	4.10	4.13

经 Oxford University Press(Oxford) 同意,复制自 R. M. C. Dawson, D. C. Elliott, W. H. Elliott 和 K. M. Jones 编辑的 *Data for Biochemical Research*, 第二版, © Oxford University Press(1969)。

IV 用于制备缓冲剂的酸和碱的 pK_a 值

下列表格中的酸和碱是为酶测定中制备缓冲剂时使用。对某一特定化合物的选择取决于许多因素。例如，对于反应中含有金属离子为辅助因子时，多羧酸就不宜选用；氨基酸也不适于选用包含有以氨基酸为底物的反应。使用可概括所需范围的一个酸和一个碱就可将缓冲剂的组分保持到最低数目。例如：顺丁烯二酸和 Tris(三羟甲基氨基甲烷)可混合成 pH 5.7—8.6 的 Tris-顺丁烯二酸缓冲剂(这比用顺丁烯二酸-NaOH 和 Tris-HCl 好)。

多价离子的活性系数随着浓度而显著地改变，因而储备缓冲剂应于稀释后做一次查对，有必要应进行校正。一般规定，在分析完了时检查一下反应混合物 pH，以保证 pH 是恒定的。

自由酸或碱	分子量	pK_a 在 25°C	自由酸或碱	分子量	pK_a 在 25°C
焦磷酸	117.98	0.85(pK_{a1})	2-甲基丙烷-1,2,3-三羧酸(β -甲基三羧酸)	190.15	3.53(pK_{a1})
草酸	95.07	1.19(pK_{a1})	马尿酸	179.18	3.64
甘油磷酸	172.08	1.47(pK_{a1})	丙烷-1,2,3-三羧酸(丙三羧酸)	176.12	3.67(pK_{a1})
乙二胺四乙酸(EDTA)	292.24	1.70(pK_{a1})	甲酸	46.02	3.75
组氨酸	155.16	1.82(pK_{a1})	3,3-二甲基戊二酸	160.17	3.79(pK_{a1})
焦磷酸	177.98	1.96(pK_{a2})	1,1-环戊烷二乙酸(3,3-四甲基戊二酸)	186.21	3.82(pK_{a1})
顺丁烯二酸	116.07	2.00(pK_{a1})	衣康酸	130.1	3.84(pK_{a1})
苯六酸	342.17	2.08(pK_{a1})	乳酸	90.08	3.86
磷酸	98.0	2.12(pK_{a1})	苯五羧酸	298.16	3.94(pK_{a3})
含有 4 个水的马钱子碱	466.53	2.30(pK_{a1})	苯-1,3,5-三羧酸	210.14	3.98(pK_{a2})
苯五酸	296.18	2.34(pK_{a1})	巴比妥酸	128.09	3.98
甘氨酸	75.07	2.34(pK_{a1})	抗坏血酸	176.12	4.1(pK_{a1})
苯 1,2,4,5-四羧酸(苯均四酸)	254.15	2.43(pK_{a1})	2,2-二甲基琥珀酸	146.14	4.11(pK_{a1})
苯六酸	342.17	2.46(pK_{a2})	琥珀酸	118.09	4.19(pK_{a1})
EDTA	292.24	2.6(pK_{a2})	苯甲酸	122.12	4.20
丙二酸	146.02	2.85(pK_{a1})	草酸	95.07	4.21(pK_{a2})
苯二酸	116.13	2.90	苯-1,2,3-三羧酸	246.18	4.25(pK_{a2})
苯五酸	298.16	2.95(pK_{a2})	3,6-桥甲基-1,2,3,6-四羧基苯二酸“EMTA”	183.62	4.3(pK_{a1})
水杨酸	138.12	2.98	(桥-5-正冰片烯-2,3-二羧酸“ENDCA”)		
苯连三酸(半羧酸)	246.18	2.98(pK_{a1})	2,2-二甲基戊二酸	160.17	4.31(pK_{a1})
1,4-二哌嗪(磺酰乙烷)	302.37	3.0(pK_{a3})	丁烷-1,2,3,4-四羧酸	234.12	4.38(pK_{a2})
酒石酸	150.09	3.02(pK_{a1})	苯六酸	342.17	4.44(pK_{a4})
反丁烯二酸	116.07	3.03(pK_{a1})	苯-1,2,4,5-四羧酸	254.15	4.44(pK_{a3})
甘氨酸	132.12	3.06	反丁烯二酸	116.07	4.47(pK_{a2})
柠檬酸	192.12	3.06(pK_{a1})	环戊烷-1,2,3,4-四羧酸	246.17	4.48(pK_{a2})
环戊烷-1,2,3,4-四羧酸	246.17	3.07(pK_{a1})	酒石酸	150.09	4.54(pK_{a2})
o-苯二酸	166.13	3.10(pK_{a1})	柠檬酸	210.14	4.74(pK_{a2})
苯-1,2,4,5-四羧酸	254.15	3.13(pK_{a2})	乙酸	60.05	4.76
苯-1,3,5-三羧酸	210.14	3.16(pK_{a1})	正丁酸	88.1	4.82
苯六酸	342.17	3.24(pK_{a3})	丙烷-1,2,3-三羧酸	176.12	4.84(pK_{a2})
二甲基丙二酸	132.12	3.29(pK_{a1})	苯-1,3,5-三羧酸	210.14	4.85(pK_{a3})
苯乙醇酸	152.15	3.36			
丁烷-1,2,3,4-四羧酸	234.12	3.36(pK_{a1})			
苹果酸	134.09	3.40(pK_{a1})			
1,1-环己烷二乙酸	200.18	3.52(pK_{a1})			

(续表)

自由酸或碱	分子量	pK_a 在25°C	自由酸或碱	分子量	pK_a 在25°C
丙酸	74.08	4.87	咪唑	68.08	7.0
2-甲基丙烷-1, 2, 3-三羧酸(β -甲基三羧酸)	190.15	5.02(pK_{a2})	氯化2-(氨基乙烷)三甲基铵“CHOLAMINE”	156.69	7.1
苹果酸	134.09	5.05(pK_{a2})	<i>N,N</i> -Bis(2-羟乙基)-2-氨基乙烷磺酸“BES”	213.25	7.15(pK_{a2})
苯戊羧酸	298.16	5.07(pK_{a4})	2-甲基丙烷-1, 2, 3-三羧酸(β -甲基三羧酸)	190.15	7.20(pK_{a3})
吡啶	79.1	5.23	2-(正吗啉代)丙烷磺酸“MOPS”	209.27	7.2(pK_{a2})
<i>o</i> -苯二酸	116.13	5.27(pK_{a2})	磷酸	98.0	7.21(pK_{a2})
柠檬酸	192.12	5.40(pK_{a3})	<i>N</i> -Tris(羟甲基)甲基-2-氨基乙烷磺酸“TES”	229.28	7.5(pK_{a2})
丁烷-1, 2, 3, 4-四羧酸	234.12	5.45(pK_{a3})	<i>N</i> -2-羟乙基哌嗪- <i>N'</i> -2-乙烷磺酸“HEPES”	238.31	7.55(pK_{a2})
苯六酸	342.17	5.50(pK_{a5})	2-羟乙基亚氨基-Tris(羟甲基)甲烷“MONO-TRIS”	165.18	7.83
2,2-二甲基戊二酸	160.17	5.51(pK_{a2})	含有4个水的马钱子碱	466.53	7.95(pK_{a2})
衣康酸	130.1	5.55(pK_{a2})	4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸“EPSP”	252.23	8.0
环戊烷-1,2,3,4-四羧酸	246.17	5.57(pK_{a3})	Tris(羟甲基)氨基甲烷“TRIS”	121.14	8.1
琥珀酸	118.09	5.57(pK_{a2})	<i>N</i> -Tris(羟甲基)甲基甘氨酸“TRICINE”	100.18	8.15
苯-1,2,4,5-四羧酸	254.15	5.61(pK_{a4})	甘氨酸胺	74.04	8.2
苯连三酸(半苯酸)	246.18	5.87(pK_{a3})	<i>N,N</i> -Bis(2-羟乙基)甘氨酸“BICINE”	163.18	8.35
二甲苯丙二酸	132.12	5.98(pK_{a2})	<i>N</i> -Tris(羟甲基)甲基-2-氨基乙烷磺酸“TAPS”	243.3	8.4(pK_{a2})
组氨酸	156.16	6.00(pK_{a2})	正甘氨酸甘氨酸	132.12	8.4
氢氧化铵	34.0	6.03	组氨酸	155.16	9.17(pK_{a3})
碳酸($H_2CO_3+CO_2$)	62(CO_2)	6.10(pK'_{a1})	硼酸	43.82	9.24
丙二酸	104.06	6.10(pK_{a2})	焦磷酸	177.98	9.39(pK_{a4})
2-(正吗啉代)-乙烷磺酸“MES”	195.2	6.15(pK_{a2})	乙醇胺	61.08	9.44
甘油磷酸	172.08	6.19(pK_{a2})	甘氨酸	75.07	9.6(pK_{a2})
丙烷-1,2,3-三羧酸	176.12	6.20(pK_{a3})	三甲基胺	59.11	9.74
苯五酸	298.16	6.25(pK_{a5})	环戊烷-1,2,3,4-四羧酸	246.17	10.06(pK_{a4})
顺丁烯二酸	116.07	6.26(pK_{a2})	碳酸($H_2CO_3+CO_2$)	62(CO_2)	10.25(pK_{a2})
2,2-二甲基琥珀酸	146.14	6.29(pK_{a2})	3-氨基环己烷-1-丙烷磺酸“CAPS”	221.32	10.40(pK_{a2})
EDTA	292.24	6.30(pK_{a3})	EDTA	292.24	10.6(pK_{a4})
3,3-二甲基戊二酸	160.17	6.31(pK_{a2})	甲胺	31.06	10.64
Bis(2-羟乙基)亚氨基-tris(羟甲基)-甲烷“BIS-TRIS”	209.24	6.46	二甲胺	45.09	10.72
苯六酸	342.17	6.59(pK_{a6})	乙胺	45.09	10.75
正-(2-乙酰氨基)亚氨基-二乙酸“ADA”	190.17	6.6(pK_{a3})	三乙胺	101.19	10.76
丁烷-1,2,3,4-四羧酸	234.12	6.63(pK_{a4})	二乙胺	73.14	10.98
焦磷酸	177.98	6.68(pK_{a3})	抗坏血酸	176.12	11.79(pK_{a2})
1,1-环戊烷二乙酸(3,3-四甲基戊二酸)	186.21	6.70(pK_{a2})	磷酸	98.0	12.32(pK_{a3})
1,4-二哌嗪(乙烷磺酸)“PIPES”	302.37	6.8(pK_{a4})			
正-(2-乙酰氨基)-2-氨基乙烷磺酸	182.20	6.9(pK_{a2})			
1,1-环己二乙酸	200.18	6.94(pK_{a2})			
3,6-桥甲基-1,2,3,6-四羟基苯二酸“EMTA” (“ENDCA”)	183.62	7.0(pK_{a2})			

V 水溶液中离子的活性系数

离 子	离 子 浓 度 (M)		
	0.001 M	0.01 M	0.1 M
H ⁺	0.975	0.933	0.86
OH ⁻	0.975	0.925	0.805
醋酸 ⁻	0.975	0.928	0.82
H ₂ PO ₄ ⁻	0.975	0.928	0.744
HPO ₄ ²⁻	0.903	0.740	0.445
PO ₄ ³⁻	0.796	0.505	0.16
H ₂ 柠檬酸 ⁻	0.975	0.926	0.81
H柠檬酸 ²⁻	0.903	0.741	0.45
柠檬酸 ³⁻	0.796	0.51	0.18
HCO ₃ ⁻	0.975	0.928	0.82
CO ₃ ²⁻	0.903	0.742	0.445

VI 用于离子强度的 pK_a 校正因子

校正: ΔpK_a

$I/2$	$Z = +1$	$Z = 0$	$Z = -1$	$Z = -2$
0.01	+0.04	-0.04	-0.13	-0.22
0.05	+0.08	-0.08	-0.25	-0.42
0.10	+0.11	-0.11	-0.32	-0.53

给出的数值为 20°C 时的。0 与 37°C 间的数值基本上相同。

$I/2$ = 离子强度 (全部离子)

Z = 缓冲剂结合酸上的电荷

在任一总离子强度时: $pK'_a = pK_a + \Delta pK_a$

校正依据 Debye-Hückel 公式:

$$\log \gamma = -0.509 Z^2 \sqrt{I/2}$$

式中, γ = 离子活性系数。

pK_a 和 pK'_a 的关系表示如下:

$$\begin{aligned} \text{pH} &= pK_a + \log \frac{\gamma_{\text{C.B.}} [\text{C.B.}]}{\gamma_{\text{O.A.}} [\text{O.A.}]} = pK_a + \log \frac{\gamma_{\text{C.B.}}}{\gamma_{\text{O.A.}}} + \log \frac{[\text{C.B.}]}{[\text{O.A.}]} = pK_a + \Delta pK_a + \log \frac{[\text{C.B.}]}{[\text{O.A.}]} \\ &= pK'_a + \log \frac{[\text{C.B.}]}{[\text{O.A.}]} \end{aligned}$$

式中,

$$pK'_a = pK_a + \Delta pK_a$$

和

$$\Delta pK_a = \log \frac{\gamma_{\text{C.B.}}}{\gamma_{\text{O.A.}}}$$

VII 常见氨基酸的电离常数, pK_a , pK_b 和 pI 数值

化 合 物	分子量	共 轭 酸	K_a	pK_a	共 轭 碱	K_b	pK_b	pI
α -丙氨酸	89.1	α -COOH	4.47×10^{-3}	2.35	α -COO ⁻	2.24×10^{-12}	11.65	6.02
		α -NH ₃ ⁺	2.04×10^{-10}	9.69	α -NH ₂	4.90×10^{-5}	4.31	
β -丙氨酸	89.1	α -COOH	2.51×10^{-4}	3.60	α -COO ⁻	3.98×10^{-11}	10.40	6.90
		β -NH ₃ ⁺	6.46×10^{-11}	10.19	β -NH ₂	1.55×10^{-4}	3.81	
精氨酸	174.2	α -COOH	6.76×10^{-3}	2.17	α -COO ⁻	1.48×10^{-12}	11.83	10.76
		α -NH ₃ ⁺	9.12×10^{-10}	9.04	α -NH ₂	1.10×10^{-5}	4.96	
		胍-NH ₂	3.31×10^{-13}	12.48	胍-NH	3.02×10^{-2}	1.52	
天门冬酰胺	132.1	α -COOH	9.55×10^{-3}	2.02	α -COO ⁻	1.05×10^{-12}	11.98	5.41
		α -NH ₃ ⁺	1.58×10^{-9}	8.8	α -NH ₂	6.31×10^{-6}	5.2	
天门冬氨酸	133.1	α -COOH	8.13×10^{-3}	2.09	α -COO ⁻	1.23×10^{-12}	11.91	2.98
		β -COOH	1.38×10^{-4}	3.86	β -COO ⁻	7.25×10^{-11}	10.14	
		α -NH ₃ ⁺	1.51×10^{-10}	9.82	α -NH ₂	6.61×10^{-5}	4.18	
瓜氨酸	175.2	α -COOH	3.72×10^{-3}	2.43	α -COO ⁻	2.69×10^{-12}	11.57	5.92
		α -NH ₃ ⁺	3.89×10^{-10}	9.41	α -NH ₂	2.57×10^{-5}	4.59	
半胱氨酸	121.2	α -COOH	1.95×10^{-2}	1.71	α -COO ⁻	5.13×10^{-13}	12.29	5.02
		β -SH	4.68×10^{-9}	8.33	α -NH ₂	2.14×10^{-6}	5.67	
		α -NH ₃ ⁺	1.66×10^{-11}	10.78	β -S	6.03×10^{-4}	3.22	
胱氨酸	240.3	α -COOH	2.24×10^{-2}	1.65	α -COO ⁻	4.47×10^{-13}	12.35	5.06
		α -COOH	5.50×10^{-3}	2.26	α -COO ⁻	1.82×10^{-12}	11.74	
		α -NH ₃ ⁺	1.41×10^{-8}	7.85	α -NH ₂	7.08×10^{-7}	6.15	
		α -NH ₃ ⁺	1.41×10^{-10}	9.85	α -NH ₂	7.08×10^{-5}	4.15	
谷氨酸	147.1	α -COOH	6.46×10^{-3}	2.19	α -COO ⁻	1.55×10^{-12}	11.81	3.22
		γ -COOH	5.62×10^{-5}	4.25	γ -COO ⁻	1.78×10^{-10}	9.75	
		α -NH ₃ ⁺	2.14×10^{-10}	9.67	α -NH ₂	4.68×10^{-5}	4.33	
谷氨酰胺	146.1	α -COOH	6.76×10^{-3}	2.17	α -COO ⁻	1.48×10^{-12}	11.83	5.65
		α -NH ₃ ⁺	7.41×10^{-10}	9.13	α -NH ₂	1.35×10^{-5}	4.87	
甘氨酸	75.1	α -COOH	4.57×10^{-3}	2.34	α -COO ⁻	2.19×10^{-12}	11.66	5.97
		α -NH ₃ ⁺	2.51×10^{-10}	9.6	α -NH ₂	3.98×10^{-5}	4.4	
组氨酸	155.2	α -COOH	1.51×10^{-2}	1.82	α -COO ⁻	6.61×10^{-13}	12.18	7.58
		咪唑-NH ⁺	1.0×10^{-7}	6.0	咪唑-N	1.0×10^{-9}	8.0	
		α -NH ₃ ⁺	6.76×10^{-10}	9.17	α -NH ₂	1.48×10^{-5}	4.83	
高半胱氨酸	135.2	α -COOH	6.03×10^{-3}	2.22	α -COO ⁻	1.66×10^{-12}	11.78	5.54
		α -NH ₃ ⁺	1.35×10^{-9}	8.87	α -NH ₂	7.41×10^{-6}	5.13	
		γ -SH	1.38×10^{-11}	10.86	γ -S ⁻	7.25×10^{-4}	3.14	
高胱氨酸	268.3	α -COOH	2.57×10^{-2}	1.59	α -COO ⁻	3.89×10^{-13}	12.41	5.53
		α -COOH	2.88×10^{-3}	2.54	α -COO ⁻	3.47×10^{-12}	11.46	
		α -NH ₃ ⁺	3.02×10^{-9}	8.52	α -NH ₂	3.31×10^{-6}	5.48	
		α -NH ₃ ⁺	3.63×10^{-10}	9.44	α -NH ₂	2.76×10^{-5}	4.56	
羟赖氨酸	162.2	α -COOH	7.41×10^{-3}	2.13	α -COO ⁻	1.35×10^{-12}	11.87	9.15
		α -NH ₃ ⁺	2.40×10^{-9}	8.62	α -NH ₂	4.17×10^{-6}	5.38	
		ϵ -NH ₃ ⁺	2.14×10^{-10}	9.67	ϵ -NH ₂	4.68×10^{-5}	4.33	
羧脯氨酸	131.1	α -COOH	1.20×10^{-2}	1.92	α -COO ⁻	8.32×10^{-13}	12.08	5.83
		α -NH ₃ ⁺	1.86×10^{-10}	9.73	α -NH ₂	5.37×10^{-5}	4.27	
异亮氨酸	131.2	α -COOH	4.37×10^{-3}	2.36	α -COO ⁻	2.29×10^{-12}	11.64	6.02
		α -NH ₃ ⁺	2.09×10^{-10}	9.68	α -NH ₂	4.78×10^{-5}	4.32	

(续表)

化 合 物	分子量	共 轭 酸	K_a	pK_a	共 轭 碱	K_b	pK_b	pI
亮氨酸	131.2	α -COOH	4.37×10^{-3}	2.36	α -COO ⁻	2.29×10^{-12}	11.64	5.98
		α -NH ₃ ⁺	2.51×10^{-10}	9.60	α -NH ₂	3.98×10^{-5}	4.40	
赖氨酸	146.2	α -COOH	6.61×10^{-3}	2.18	α -COO ⁻	1.51×10^{-13}	11.82	9.74
		α -NH ₃ ⁺	1.12×10^{-9}	8.95	α -NH ₂	8.91×10^{-6}	5.05	
		ϵ -NH ₃ ⁺	2.95×10^{-11}	10.53	ϵ -NH ₂	3.39×10^{-4}	3.47	
蛋氨酸	149.2	α -COOH	5.25×10^{-3}	2.28	α -COO ⁻	1.91×10^{-12}	11.72	5.75
		α -NH ₃ ⁺	6.17×10^{-10}	9.21	α -NH ₂	1.62×10^{-5}	4.79	
鸟氨酸	132.2	α -COOH	1.15×10^{-2}	1.94	α -COO ⁻	8.71×10^{-13}	12.06	9.70
		α -NH ₃ ⁺	2.24×10^{-9}	8.65	α -NH ₂	4.47×10^{-6}	5.35	
		δ -NH ₃ ⁺	1.74×10^{-11}	10.76	δ -NH ₂	5.76×10^{-4}	3.24	
苯丙氨酸	165.2	α -COOH	1.48×10^{-2}	1.83	α -COO ⁻	6.76×10^{-13}	12.17	5.48
		α -NH ₃ ⁺	7.41×10^{-10}	9.13	α -NH ₂	1.35×10^{-5}	4.87	
脯氨酸	115.1	α -COOH	1.02×10^{-2}	1.99	α -COO ⁻	9.77×10^{-13}	12.01	6.30
		α -NH ₃ ⁺	2.51×10^{-11}	10.60	α -NH ₂	3.98×10^{-4}	3.40	
丝氨酸	105.1	α -COOH	6.17×10^{-3}	2.21	α -COO ⁻	1.62×10^{-12}	11.79	5.68
		α -NH ₃ ⁺	7.08×10^{-10}	9.15	α -NH ₂	1.41×10^{-5}	4.85	
氨基乙磺酸	125.1	-SO ₃ H	3.16×10^{-2}	1.5	-SO ₃ ⁻	3.16×10^{-13}	12.5	5.12
		α -NH ₃ ⁺	1.82×10^{-9}	8.75	α -NH ₂	5.50×10^{-6}	5.26	
苏氨酸	119.1	α -COOH	2.35×10^{-3}	2.63	α -COO ⁻	4.27×10^{-12}	11.37	6.53
		α -NH ₃ ⁺	3.72×10^{-11}	10.43	α -NH ₂	2.69×10^{-4}	3.57	
色氨酸	204.2	α -COOH	4.17×10^{-3}	2.38	α -COO ⁻	2.40×10^{-12}	11.62	5.88
		α -NH ₃ ⁺	4.07×10^{-10}	9.39	α -NH ₂	2.46×10^{-5}	4.61	
酪氨酸	181.2	α -COOH	6.31×10^{-3}	2.20	α -COO ⁻	1.59×10^{-11}	11.80	5.65
		α -NH ₃ ⁺	7.76×10^{-10}	9.11	α -NH ₂	1.29×10^{-5}	4.89	
		-OH	8.51×10^{-11}	10.07	-O ⁻	1.18×10^{-4}	3.93	
缬氨酸	117.1	α -COOH	4.79×10^{-3}	2.32	α -COO ⁻	2.09×10^{-12}	11.68	5.97
		α -NH ₃ ⁺	2.40×10^{-10}	9.62	α -NH ₂	4.17×10^{-5}	4.38	
K 和 pK 值为右侧所示数字			K_{a1}	pK_{a1}	K_{b3}	pK_{b3}		
			K_{a2}	pK_{a2}	K_{b2}	pK_{b2}		
			K_{a3}	pK_{a3}	K_{b1}	pK_{b1}		

VIII $\Delta G'$ 值用于具有生物学重要意义的化合物的水解作用

一 般 类 型	范 例	水 解 产 物	$\Delta G'$ 近似值 (pH~7) (千卡/摩尔)
磷酸硫酸衍 焦磷酸	磷酸腺苷 (APS)	AMP + SO ₄ ²⁻	-18
	无机 PP _i	2P _i	-4.2
	ATP	ADP + P _i	-7.7
	ATP	AMP + PP _i	-9.9
	ADP	AMP + P _i	-6.4
酰基磷酸	乙酰磷酸	乙酰基 + P _i	-10
	1,3-2PGA	3-PGA + P _i	-12
酰基腺苷酸	氨基酰磷酸	氨基甲酸盐 + P _i	-12 (pH 9.5)
	氨基腺苷酸	氨基酸 + AMP	-13

(续表)

一般类型	范 例	水 解 产 物	$\Delta G'$ 近似值(pH~7) (千卡/摩尔)
氨基酸酯	乙酰酯甘氨酸	甘氨酸+乙醇	-8
	甘氨酸 <i>t</i> RNA	甘氨酸+ <i>t</i> RNA	-8
苯酯	<i>p</i> -NO ₂ -苯基乙酸	<i>p</i> -硝基苯+醋酸	-13
	<i>p</i> -NO ₂ -苯基硫酸	<i>p</i> -硝基苯+SO ₄ ²⁻	-13
二磷酸糖核苷酸	UDPG	UDP+葡萄糖	-7.3
环磷酸二酯	3',5'-环 AMP	5'-AMP	-10
烯醇磷酸酯	磷酸烯醇丙酮酸(PEP)	氧化丙酮酸+P _i	-13.8
磷酸肌	磷酸肌酸	肌酸+P _i	-10.5
	磷酸精氨酸	精氨酸+P _i	-10.5
硫酯	乙酰-S-CoA	CoASH+醋酸	-8.2
	乙酰乙酯-S-CoA	CoASH+乙酰乙酸	-10.5
	乙酰肌苷	肉毒碱+醋酸	-7.2
	乙酰胆碱	胆碱+醋酸	-6
半酯酰-1-磷酸	1-磷酸葡萄糖	葡萄糖+P _i	-5
单磷酸酯	6-磷酸葡萄糖	葡萄糖+P _i	-3
	α -磷酸甘油	甘油+P _i	-2.5
	AMP	腺苷+P _i	-2
胺	谷氨酰胺	谷氨酸+P _i	-3.4
	天冬酰胺	天冬氨酸+P _i	-3.4
肽键	甘酰甘氨酸	氨基酸	-0.5

IX 氧化还原电极反应的标准还原电位*

反 应	电 极 反 应 (书 写 为 还 原 式)	E'_0 于 pH 7.0(伏)
1	$\frac{1}{2} O_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2O$	0.816
2	$Fe^{+3} + 1e^- \longrightarrow Fe^{+2}$	0.771
3	$SO_4^{2-} + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow SO_3^{2-} + H_2O$	0.48
4	$NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow NO_2^- + H_2O$	0.42
5	$2I^- + 2e^- \longrightarrow I_2$	0.536
6	细胞色素- <i>a</i> ₃ -Fe ⁺³ +1e ⁻ →细胞色素- <i>a</i> ₃ -Fe ⁺²	0.55
7	$\frac{1}{2} O_2 + H_2O + 2e^- \longrightarrow H_2O_2$	0.30
8	细胞色素- <i>a</i> -Fe ⁺³ +1e ⁻ →细胞色素- <i>a</i> -Fe ⁺²	0.29
9	细胞色素- <i>c</i> -Fe ⁺³ +1e ⁻ →细胞色素- <i>c</i> -Fe ⁺²	0.25
10	2,6-二氯酚靛酚 _(ox) +2H ⁺ +2e ⁻ →2,6-DCPP _(red)	0.22
11	丁烯酰-S-CoA+2H ⁺ +2e ⁻ →丁酰-S-CoA	0.19
12	$Cu^{+2} + 1e^- \longrightarrow Cu^+$	0.15
13	高铁血红蛋白-Fe ⁺³ +1e ⁻ →血红蛋白-Fe ⁺²	0.139
14	辅酶 Q+2H ⁺ +2e ⁻ →辅酶 Q-H ₂	0.10
15	脱氢抗坏血酸+2H ⁺ +2e ⁻ →抗坏血酸	0.06
16	变肌红蛋白-Fe ⁺³ +1e ⁻ →肌红蛋白-Fe ⁺²	0.046
17	延胡索酸+2H ⁺ +2e ⁻ →琥珀酸	0.030
18	美蓝 _(ox) +2H ⁺ +2e ⁻ →美蓝 _(red)	0.011
19	丙酮酸+NH ₃ +2H ⁺ +2e ⁻ →丙氨酸	-0.13

(续表)

反 应	电 极 反 应 (书 写 为 还 原 式)	E'_0 于 pH 7.0(伏)
20	α -酮戊二酸 + $\text{NH}_3 + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow$ 谷氨酸 + H_2O	-0.14
21	乙醛 + $2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow$ 乙醇	-0.163
22	草酰乙酸 + $2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow$ 苹果酸	-0.175
23	$\text{FAD} + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow \text{FADH}_2$	-0.18**
24	丙酮酸 + $2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow$ 乳酸	-0.190
25	核黄素 + $2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow$ 核黄素- H_2	-0.200
26	胱氨酸 + $2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow$ 2 半胱氨酸	-0.22
27	$\text{GSSG} + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow 2\text{GSH}$	-0.23
28	$\text{S}^0 + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow \text{H}_2\text{S}$	-0.23
29	1,3-二磷酸甘油酸 + $2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow \text{GAP} + \text{P}_i$	-0.29
30	乙酰乙酸 + $2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow \beta$ -羟基丁酸	-0.290
31	硫辛酸(ox) + $2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow$ 硫辛酸(red)	-0.29
32a	$\text{NAD}^+ + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$	-0.320
b	$\text{NADP}^+ + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow \text{NADPH} + \text{H}^+$	-0.320
33	丙酮酸脱氢酶 + $\text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow$ 苹果酸	-0.33
34	尿酸 + $2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow$ 黄嘌呤	-0.36
35	乙酰-S-CoA + $2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow$ 乙醛 + CoA	-0.41
36	$\text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow$ 甲酸	-0.420
37	$\text{H}^+ + 1e^- \rightarrow \frac{1}{2} \text{H}_2$	-0.420
38	铁氧还蛋白- $\text{Fe}^{+3} + 1e^- \rightarrow$ 铁氧还蛋白- Fe^{+2}	-0.432
39	葡萄糖酸 + $2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow$ 葡萄糖 + H_2O	-0.45
40	3-磷酸甘油酸 + $2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow$ 甘油醛-3-磷酸 + H_2O	-0.55
41	甲基紫精(ox) + $2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow$ 甲基紫精(red)	-0.55
42	乙酸 + $2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow$ 乙醛	-0.60
43	琥珀酸 + $\text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow \alpha$ -酮戊二酸 + H_2O	-0.67
44	乙酸 + $\text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow$ 丙酮酸	-0.70

* 标准条件: 除 H^+ 保持在 $10^{-7} M$ 外, 所有的成分为单位活性, 气体为 1 大气压。** 给定数值用于自由 FAD/FADH_2 , 蛋白质结合辅酶的 E'_0 是变换的。

X 具有生物化学重要意义的化合物的吸收最大值和吸收系数

化 合 物	$\lambda_{\text{最大}}$ (纤米)	摩尔吸收系数* ($a_m \times 10^{-3}$)	化 合 物	$\lambda_{\text{最大}}$ (纤米)	摩尔吸收系数 ($a_m \times 10^{-3}$)
腺嘌呤	260.5	13.3	鸟苷, GMP, GDP, GTP	252	13.7
腺苷, AMP, ADP, ATP	259	15.4	烟酰胺	260	4.6
胞苷	271	8.9	苯丙氨酸(溶于 0.1 N HCl)	257.5	0.19
胞嘧啶	267	6.1	苯丙氨酸(溶于 0.1 N NaOH)	258	0.206
CMP, CDP, CTP,	271	9.1	磷酸吡哆醛	388	4.9
NAD^+ , NADP^+	259	18		330	2.5
NADH , NADPH	339	6.22	核黄素	450	12.2
	259	15		375	10.6
黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)	450	11.3		260	27.7
	375	9.3	磷酸核黄素(FMN)	450	12.2
	260	37		375	10.4
鸟嘌呤	275.5	8.1		260	27.1
	246	10.7			

(续表)

化 合 物	$\lambda_{\text{最大}}$ (纤米)	摩尔吸收系数 ($a_m \times 10^{-3}$)	化 合 物	$\lambda_{\text{最大}}$ (纤米)	摩尔吸收系数 ($a_m \times 10^{-3}$)
盐酸硫胺素	267	9.0	酪氨酸(溶于 0.1 N HCl)	274.5	1.34
	235	11.5		223	8.2
胸腺核苷	267	9.7	酪氨酸(溶于 0.1 N NaOH)	293.5	2.33
	207.5	9.6		240	11.1
胸腺嘧啶	264	7.9	尿嘧啶	259.5	8.2
色氨酸(溶于 0.1 N HCl)	278	5.6	尿苷, UMP, UDP, UTP, UDPG, UDPGal	262	10.0
	218	33.5			
色氨酸(溶于 0.1 N NaOH)	280.5	5.43			
	221.5	34.6			

* 吸收系数给定用于 1 厘米光程。

XI 碳水化合物及其衍生物的比旋

化 合 物	比旋 $[\alpha]_D^{20-25^\circ}$	化 合 物	比旋 $[\alpha]_D^{20-25^\circ}$
β -D-阿拉伯糖	-175 \rightarrow -103*	α -D-葡萄糖	+112 \rightarrow +52.7
α -L-阿拉伯糖	+55.4 \rightarrow +105	β -D-葡萄糖	+18.7 \rightarrow +52.7
β -L-阿拉伯糖	+190.6 \rightarrow +104.5	α -L-葡萄糖	-95.5 \rightarrow -51.4
β -D-果糖	-133.5 \rightarrow -92	β -D-葡萄糖醛酸	+11.7 \rightarrow +36.3
D-半乳糖酸	-11.2 \rightarrow +57.6	D-甘油醛	+13.5
α -D-半乳糖胺	+121 \rightarrow +80	α -D-甘露糖	+29.3 \rightarrow +14.5
α -D-半乳糖	+150.7 \rightarrow +80.2	β -D-甘露糖	-16.3 \rightarrow +14.5
β -D-半乳糖	+52.8 \rightarrow +80.2	β -D-甘露糖醛酸	-47.9 \rightarrow -23.9
β -D-半乳糖醛酸	+27 \rightarrow +55.6	α -L-鼠李糖	-8.6 \rightarrow +8.2
D-葡萄糖酸	-6.7 \rightarrow +11.9	α -D-木糖	+9.36 \rightarrow +18.8
α -D-葡萄糖胺	+100 \rightarrow +47.5		

* 第一个数字表示最初结构的 $[\alpha]_D^{20}$ ；第二个数字表示经过变旋后 α 及 β 型平衡混合物的 $[\alpha]_D^{20}$ 。醛糖酸与内酯平衡。

XII 放射性同位素在生物学研究中的应用

同 位 素	半 衰 期	衰变能量(兆电子伏特)	
		$\beta(\beta^- \text{ 或 } \beta^+)$	γ
钙-45	163 天	0.254	
碳-14	5700 年	0.154	
铯-137	33 年	0.52	0.032
		1.18	0.662
氯-36	4.4×10^5 年	0.714	
铬-51	27.8 天		0.267
			0.32
钴-60	5.3 年	0.31	1.17
			1.33

(续表)

同 位 素	半 衰 期	衰变能量(兆电子伏特)	
		$\beta(\beta^- \text{ 或 } \beta^+)$	γ
铜-64	12.8 小时	0.575 0.654	1.35
金-198	2.69 天	0.290 0.97 1.38	0.411 0.676 1.087
氢-3	12.3 年	0.0179	
碘-131	8.1 天	0.250 0.31 0.608	0.080 0.284 0.364 0.638
铁-55	2.9 年		K 层电子俘获: 0.232
铁-59	45.1 天	0.27 0.47 1.57	0.19 1.10 1.29
铅-210	25 年	0.018 0.029	0.047
镁-54	314 天	1.0	0.94
汞-203	46.6 天	0.212	0.279
钼-99	66 小时	<0.2 0.445 1.23	0.04 0.367 0.740 0.780
镍-63	85 年	0.063	
磷-32	14.3 天	1.718	
磷-33	25.2 天	0.248	
钾-42	12.4 小时	1.98 3.58	1.51
铷 86	18.7 天	1.82 0.72	1.03
硒 75	123 天		0.025, 0.066, 0.081, 0.097, 0.121, 0.136, 0.199, 0.265, 0.280, 0.305, 0.402
钠-22	2.6 年	0.55 0.58 1.8	0.51 1.27
钠 24	15.06 小时	1.390	1.38 2.758
铯 90	28 年	0.54	
硫-35	87.1 天	0.167	
镉-99	2.1×10^5 年	0.293	
锌-65	244 天	0.325	0.201 1.11
镓-95	65 天	0.84 0.371	0.72

(吕彦俾译 董振芳校)

练习题答案

第一章 水溶液和酸-碱化学

溶液浓度

- (a) 78.95 克/升, (b) 7.895% (重量/体积), (c) 7895 毫克 %, (d) 0.711 M, (e) 2.134 等渗摩尔, (f) 2.134.
- (a) 39.52 毫升, (b) 18.6% (重量/重量), (c) 20.24% (重量/体积), (d) 1.73 m, (e) 1.86 M, (f) 5.58 等渗摩尔, (g) 0.03, (h) $\Gamma/2=5.58$.
- (a) 18.3 克 [在 0°C 时根据公式(1-17)计算]; 18.0 克 (在 0°C 时, 根据附录 II 计算), (b) 75 毫升 [根据公式(1-8)或附录 III].
- 17.15 M.

强酸和强碱——pH

5.	(a)	(b)	(c)	(d)
pH	2	4	2.3	9.57
pOH	12	10	11.7	4.43
H ⁺ 离子/升	6.023×10^{21}	6.023×10^{19}	3.0×10^{21}	1.63×10^{14}
OH ⁻ 离子/升	6.023×10^{11}	6.023×10^{13}	1.2×10^{12}	2.23×10^{19}
	(e)	(f)	(g)	(h)
pH	6.88	11.46	0	-1
pOH	7.12	2.54	14	15
H ⁺ 离子/升	7.9×10^{16}	2.1×10^{12}	6.023×10^{23}	6.023×10^{24}
OH ⁻ 离子/升	4.88×10^{16}	1.75×10^{21}	6.023×10^9	6.023×10^8
6.	(a)	(b)	(c)	(d)
[H ⁺]	$1.86 \times 10^{-3} M$	$5.14 \times 10^{-6} M$	$1.66 \times 10^{-7} M$	$2.24 \times 10^{-9} M$
[OH ⁻]	$5.4 \times 10^{-12} M$	$1.95 \times 10^{-9} M$	$6.02 \times 10^{-8} M$	$4.46 \times 10^{-6} M$
H ⁺ 离子/升	1.12×10^{21}	3.1×10^{13}	1.0×10^{17}	1.35×10^{15}
OH ⁻ 离子/升	3.26×10^{12}	1.18×10^{15}	3.6×10^{16}	2.7×10^{18}
	(e)	(f)	(g)	
[H ⁺]	$3.02 \times 10^{-10} M$	$3.9 \times 10^{-12} M$	1 M	
[OH ⁻]	$3.31 \times 10^{-5} M$	$2.57 \times 10^{-3} M$	$1 \times 10^{-14} M$	
H ⁺ 离子/升	1.82×10^{14}	2.3×10^{12}	6.023×10^{23}	
OH ⁻ 离子/升	1.99×10^{19}	1.55×10^{21}	6.023×10^9	
7.	[H ⁺]=0.4 M, [OH ⁻]= $2.5 \times 10^{-14} M$, pH=0.398, pOH=13.602.			
8.	pOH=3.42, pH=10.58.			
9.	$\alpha_{H^+}=0.071$, $\gamma_{H^+}=0.71$.			
10.	pH=12.86, pOH=1.14.			
11.	(a) 20.8 毫升, (b) 33.3 毫升, (c) 68 毫升, (d) 180 毫升, (e) 4.4×10^{-3} 毫升.			

12. (a) 12.2 M, (b) 8.2 毫升浓 HCl/500 毫升溶液, (c) 14.3 毫升浓 HCl/350 毫升溶液, (d) 666 克 (或 560 毫升) 浓 HCl + 334 克 (或毫升) 水, (e) 1.64×10^{-3} 毫升浓 HCl/升溶液.
13. (a) 400 克 NaOH/5 升溶液, (b) 0.25 克 NaOH/2 升溶液, (c) 356 克 NaOH/500 毫升溶液.
14. 202 毫升.
15. 1.06 克.
16. 24.5×10^4 毫升 (24.5 升).

弱酸和弱碱——缓冲溶液

17. (a) $K_a = 1.27 \times 10^{-4}$, (b) $\text{pH} = 2.28$, (c) 1210 毫升, (d) 1.75×10^{21} 个离子.
18. (a) $[\text{H}^+] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$, (b) $1.85 \times 10^{-2}\%$, (c) $K_a = 9.25 \times 10^{-2}$.
19. (a) $[\text{OH}^-] = 1.49 \times 10^{-12} \text{ M}$, (b) 4.46%.
20. $12K_a$.
21. (a) $\text{pH} = 11.07$, (b) 2.36%.
22. (a) $\text{p}K_a = 3.21$ 和 $\text{p}K_b = 10.79$, (b) $\text{p}K_a = 4.54$ 和 $\text{p}K_b = 9.46$, (c) $\text{p}K_a = 4.47$ 和 $\text{p}K_b = 9.53$, (d) $\text{p}K_a = 5.14$ 和 $\text{p}K_b = 8.86$.
23. (a) $\text{p}K_b = 4.68$ 和 $\text{p}K_a = 9.32$, (b) $\text{p}K_b = 5.51$ 和 $\text{p}K_a = 8.49$ (c) $\text{p}K_b = 4.11$ 和 $\text{p}K_a = 9.89$, (d) $\text{p}K_b = 3.04$ 和 $\text{p}K_a = 10.96$.
24. $\text{pH} = 11.4$.
25. (a) 1.46, (b) 4.67, (c) 9.76, (d) 12.74, (e) 9.03, (f) 4.98, (g) 11.59, (h) 9.35, (i) 5.07, (j) 5.07.
26. 1080 毫升.
27. 487.5 毫升.
28. $[\text{H}^+] = 5 \times 10^{-13} \text{ M}$, $\text{pH} = 12.3$.
29. $[\text{H}^+] = 1.66 \times 10^{-6} \text{ M}$, $\text{pH} = 8.78$.
30. $[\text{H}^+] = 7.25 \times 10^{-5} \text{ M}$, $\text{pH} = 4.14$.
31. $[\text{H}^+] = 1.6 \times 10^{-13} \text{ M}$, $\text{pH} = 12.8$.
32. $[\text{NH}_3] = 0.103 \text{ M}$, $[\text{NH}_4\text{Cl}] = 0.047 \text{ M}$.
33. (a) $\text{pH} = 12.32$, (b) $\text{pH} = 12.15$, (c) $\text{p}K'_3 = 11.79$.
34. $\text{pH} = 8.28$.
35. $\text{pH} = 10.15$.
36. $\text{pH} = 9.56$.
37. 28.9 克甲酸钠 + 75.5 毫升 1 M 甲酸/2 升溶液.
38. (a) 400 毫升 2 M H_3PO_4 + 1070 毫升 1 N KOH/40 升溶液, (b) 1000 毫升 0.8 M H_3PO_4 + 42.8 克 NaOH/40 升溶液, (c) 54 毫升 14.8 M H_3PO_4 + 1070 毫升 1 M KOH/40 升溶液, (d) 533 毫升 KH_2PO_4 + 267 毫升 Na_2HPO_4 /40 升溶液, (e) 72.5 克 KH_2PO_4 + 46.5 克 K_2HPO_4 /40 升溶液, (f) 139.1 克 K_2HPO_4 + 355 毫升 1.5 M HCl/40 升溶液, (g) 666.7 毫升 K_2HPO_4 + 133.0 毫升 2 M H_2SO_4 /40 升溶液, (h) 108.8 克 KH_2PO_4 + 133.5 毫升 2 M KOH/40 升溶液, (i) 533.3 毫升 1.5 M KH_2PO_4 + 267 毫升 1 M NaOH/40 升溶液, (j) 131.2 克 Na_3PO_4 + 1330 毫升 1 M HCl/40 升溶液.
39. 21 毫升冰醋酸和 62.2 克醋酸钾/5 升溶液.
40. (a) $\text{pH} = 6.96$, (b) $\text{pH} = 2.4$, (c) $\text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{PO}_4^-$.
41. (a) $\frac{1}{2} = \text{Tris}^0/\text{Tris}^+$, (b) $\frac{1}{1} = \text{Tris}^0/\text{Tris}^+$, (c) $\text{pH} = 8.1$, (d) $\text{pH} = 12.52$, (e) $\text{R-MH}^+ \rightleftharpoons \text{R-N}^0 + \text{H}^+$ 补充大部分耗去的 H^+ 并把一些 Tris^+ 变成 Tris^0 .
42. 形成的 $[\text{H}^+] = 1.49 \times 10^{-3} \text{ M} = 1.49$ 微摩尔/毫升.

43. (a) 两个方向的 $\beta = 4.69 \times 10^{-3} M$, (b) $BC_a = 2.47 \times 10^{-3} M$, $BC_b = 5.15 \times 10^{-3} M$.
 44. (a) $pH = 4.23$, (b) $pH = 4.23$, (c) $H_2A:HA^-:A^{2-} = 1:19.95:8.90$; $[H_2A] = 1.675 \times 10^{-3} M$,
 $[HA^-] = 33.41 \times 10^{-3} M$, $[A^{2-}] = 14.91 \times 10^{-3} M$,

氨基酸和肽

45. (a) $pH = 3.07$, (b) $pH = 6.02$, (c) $pH = 10.3$.
 46. (a) 2250 毫升, (b) 200 毫升, (c) 600 毫升, (d) 1200 毫升.
 47. (a) 250 毫升, (b) 468.8 毫升, (c) 1225 毫升, (d) 468.8 毫升.
 48. $pH = 9.45$.
 49. (a) AA^0 , (b) AA^- , (c) AA^+ .
 50. 将带一个结晶水的组氨酸盐酸盐 41.92 克 (0.2 摩尔) (AA^{2+}) 溶于少量水中, 加入 352 毫升 1 M KOH, 稀释至 1.0 升. 最终溶液含 0.152 M AA^0 和 0.048 M AA^+ .

血液缓冲剂

51. $1.2 \times 10^{-3} M$.
 52. $[CO_2]:[HCO_3^-]:[CO_3^{2-}] = 1:20:0.0283$.
 53. $pH = 7.34$.
 54. $K'_a = 0.0275$.
 55. $0.716 H^+/O_2$.

第二章 生物分子的化学

氨基酸, 肽和蛋白质

1. 在不考虑疏水性相互作用前提下, 我们推测其顺序为: 谷、丝、色、丙、精. 但谷氨酸具有轻微的疏水性 (由于它具有二个亚甲基), 而丝氨酸是非常亲水的, 因而其顺序正相反. 同样, 色氨酸较丙氨酸具有更明显的疏水性, 所以即使色氨酸的 pI 稍低于丙氨酸的 pI , 丙氨酸还是在色氨酸之前被洗脱. 其实际的顺序应为: 丝、谷、丙、色、精 (精氨酸不能洗脱下来, 除非增加了 pH).

2. 丝氨酸不移动 ($pH = pI$). 精氨酸最快地向负极移动, 随后是丙氨酸和色氨酸. 谷氨酸向正极移动.
 3. 赖-蛋-色-丝-苯丙-丙-甘.
 4. 谷-苯丙-赖-脯-赖.
 5. 蛋-天冬-苯丙-苏-丝.
 6. (a) 6.4×10^7 , (b) 2.79×10^7 , (c) 38,760, (d) 60,459, (e) 177,100.
 7. (a) 183 \AA , (b) 439.2 \AA , (c) 14,640.
 8. (a) 首先计算每个氨基酸残基的重量分数: 丝 = 0.279, 脯 = 0.311, 丙 = 0.228 和 甘 = 0.183, 然后从 $\Sigma(\text{氨基酸的重量分数}) \times (\text{氨基酸的 } \bar{v})$ 中计算脂蛋白的 \bar{v} . $\bar{v} = 0.700 \text{ 厘米}^3/\text{克}$, $\rho = 1/\bar{v} = 1.429 \text{ 克/厘米}^3$, (b) 体积 = $9.077 \times 10^{-21} \text{ 厘米}^3 = 9077 \text{ \AA}^3$, 直径 = 25.88 \AA .
 9. 25,700.
 10. 应用余弦定理, $a^2 = b^2 + c^2 - 2bc \cos A$ (式中 a , b 和 c 是三角形的边, A 是对 a 边的角) 得到 $x = 2.397 \text{ \AA}$ 和 $y = 2.151 \text{ \AA}$.
 11. $13[GS, GS-AMP, GS(AMP)_2, \dots, GS(AMP)_{12}]$.
 12. 分子量 = 33,459.
 13. 该酶可能是由分子量为 22,000 的四个亚基组成的, 每个亚基含有一个硒 (Se) 原子.

14. (a) 39,901, (b) 在 2.5 毫克/毫升时为 41,649, 在无限稀释时为 43,397.

15. 分子量=13,921.

碳水化合物

16. (a) 4, (b) 8.

17. $11[1 \rightarrow 2, 3, 4, 6; \alpha \text{ 或 } \beta, \text{ 加三个 } 1-1 \text{ 连接的双糖: } \alpha-\alpha, \alpha-\beta (\text{与 } \beta-\alpha \text{ 同样}) \text{ 和 } \beta-\beta]$.

18. 90% (纯纤维素 75 毫克水解后可产生葡萄糖 83.33 毫克).

19. 葡萄糖(1 \rightarrow 2)葡萄糖.

20. (a) 葡萄糖(α 或 $\beta 1 \rightarrow 3$)葡萄糖或葡萄糖($\beta 1 \rightarrow 4$)葡萄糖. 非还原性残基利用二个摩尔的高碘酸盐和释放一个摩尔的甲酸. 由还原残基形成的糖醇使用了三个摩尔的过碘酸盐, 释放出二个摩尔的甲醛(自碳 1 和 6)和一个摩尔的甲酸(对 1-3 相连可能性时, 由碳 5 形成, 若 1-4 相连可能性时, 则由碳 2 形成). (b) 多糖(称黑曲霉多糖或霉菌葡聚糖)由交替的 1-4 和 1-3 键连接的葡萄糖残基组成的.

21. 在 32.4 毫克的支链淀粉中有总数为 200 微摩尔的葡萄糖. (a) 产物为 2, 3, 4, 6-四甲基葡萄糖 10 微摩尔. \therefore 10 微摩尔的 2, 3-二甲基葡萄糖(从分支点)和 180 微摩尔的 2, 3, 6-三甲基葡萄糖. (b) 5%, (c) 370.

22. (a) 5, (b) 2, (c) 2, 3, 4, 6-四甲基半乳糖; 2, 3, 4-三甲基葡萄糖和 1, 3, 4, 6-四甲基果糖.

23. (a) 438,727, (b) 1,477.

脂类

24. (a) 64, (b) 40, (c) 20.

25. 556.3.

26. 730.4.

27. 2.

28. 元素分析得出 $C_{10.49}H_{14.90}O$ (或可能为 $C_{10}H_{15}O$) 或 $C_{21}H_{30}O_2$. 用冰点下降计算其分子量得出 313.8, 与 $C_{21}H_{30}O_2$ 相符合(实际分子量=314.45).

29. 用 $\bar{v}_{\text{脂蛋白}} = \sum(\text{组分的重量分数}) \times (\text{组分的 } \bar{v})$ 得到 $v = 0.833$ 厘米³/克, $\rho = 1/\bar{v} = 1.20$ 克/厘米³.

核苷酸与核酸

30. 如果 T=32.8%, A=32.8%, G=17.2%, C=17.2%.

31. (a) 3.56×10^6 , (b) 1.21 毫米, (c) DNA 的体积 = 3.8×10^{-16} 厘米³ 或全部细胞体积的 0.24%.

32. (a) $(3.56 \times 10^6) \times 2 = 7.12 \times 10^6$ 核苷酸/40 分钟 = 1.78×10^5 核苷酸键/分. (b) 0.03025 毫米/分 = 30.25 微米/分, (c) 356,000 转/40 分钟 = 8,900 转/分.

33. 40,000.

34. 3.56×10^6 编码核苷酸的 75% = 2.67×10^6 核苷酸 = 890,000 密码子. 分子量为 60,000 的蛋白质含有 500 个氨基酸. \therefore 可形成 1,780 个不同的蛋白质.

35. 49,440.

36. (a) 57.5%G+C; (b) %G+C = $2.4(T_m - 49.3)$.

37. 2.5×10^7 .

第三章 生物化学能学

1. $\Delta G' = +500$ 卡/摩尔.

2. (a) $\Delta G = -4092$ 卡/摩尔 ($\Delta G' = 0$). (b) 反应向 ADPG + PP_i 合成的方向进行.

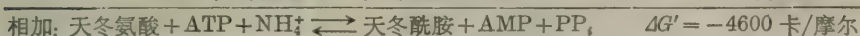
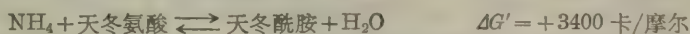
3. 葡萄糖-6-硫酸的水解更易向右进行(K'_p 更高及 $\Delta G'$ 更负), 因为产物 HSO_4^- 是一强酸($\text{p}K_a \approx 1.9$), 在 pH 7 时将自发解离成 $\text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+$. 葡萄糖-6-磷酸水解产物, $\text{HPO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$ 是一弱酸($\text{p}K_{a3} \approx 12.5$), 不能进一步解离.

4. $K'_p = 64.26$, $\Delta G' = -2466$ 卡/摩尔.

5. $\Delta G' = -12,481$ 卡/摩尔.

6. $\Delta G'_m = -1972$ 卡/摩尔(当 $K_{a2} = 2.69 \times 10^{-6}$ 时).

7. (a) 总的合成反应可看做是两个反应之和:



更快的心算法为: ATP(相当于 -8000 卡/摩尔)用于合成天冬酰胺(相当于 -3400 卡/摩尔). 因此总的 $\Delta G'$ (差值) 为 -4600 卡/摩尔.

(b) (1) 天冬氨酸 + ATP \rightleftharpoons β -天冬氨酸腺苷酸 + PP_i $\Delta G'_1 = +2000$ 卡/摩尔

(2) β -天冬氨酸腺苷酸 + $\text{NH}_4 + \text{天冬酰胺} + \text{AMP} \rightleftharpoons$ $\Delta G'_2 = -6000$ 卡/摩尔

总反应: (3) 天冬氨酸 + ATP + $\text{NH}_4^+ \rightleftharpoons$ 天冬酰胺 + PP_i + AMP $\Delta G'_3 = -4600$ 卡/摩尔

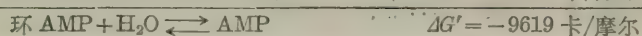
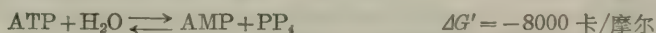
ATP(相当于 -8000 卡/摩尔)用于合成 β -天冬氨酸腺苷酸(相当于 -10,000 卡/摩尔). 因此, $\Delta G'_1 = +2000$ 卡/摩尔. 第二个反应必须具有这样一个 $\Delta G'$ 以使总反应的 $\Delta G'$ 为 -4600 卡/摩尔, $\Delta G'_1 + \Delta G'_2 = \Delta G'_3$. 因此, $\Delta G'_2 = \Delta G'_3 - \Delta G'_1 = (-4600) - (+2000) = -6600$ 卡/摩尔.

8. $[\text{G-6-P}] > 0.221 \text{ M}$.

9. $\Delta G' = -18,912$ 卡/摩尔(ATP 硫酸化酶反应的 $\Delta G'$ 为 +10,912 卡/摩尔. ATP 相当于 -8000. 因此, APS 必定相当于 -18,912).

10. $\text{ATP} \rightleftharpoons \text{环 AMP} + \text{PP}_i$ $K'_p = 0.065$

$\therefore \text{环 AMP} + \text{PP}_i \rightleftharpoons \text{ATP}$ $K'_p = 15.38$ $\Delta G' = -1619$ 卡/摩尔



11. (a) ~ 0 , (b) -3415 卡/摩尔, (c) ~ 0 , (d) -4000 卡/摩尔.

12. (a) $[\text{葡-6-P}] = 0.95 \text{ M}$, $[\text{葡-1-P}] = 0.05 \text{ M}$, $[\text{葡-6-P}]/[\text{葡-1-P}] = 19$

(b) $[\text{葡-6-P}] = 0.095 \text{ M}$, $[\text{葡-1-P}] = 0.005 \text{ M}$, $[\text{葡-6-P}]/[\text{葡-1-P}] = 19$

(c) $[\text{葡-6-P}] = 9.5 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{葡-1-P}] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{葡-6-P}]/[\text{葡-1-P}] = 19$

(d) $[\text{葡-6-P}]/9.5 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{葡-1-P}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{葡-6-P}]/[\text{葡-1-P}] = 19$

(e) $[\text{葡-6-P}] = 9.5 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{葡-1-P}] = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$, $[\text{葡-6-P}]/[\text{葡-1-P}] = 19$.

13. (a) 异柠檬酸 = 0.845 M, 乙醛酸 = 0.155 M, 琥珀酸 = 0.155 M

$$\frac{\text{异柠檬酸}}{\text{乙醛酸}} = 5.45 \quad \frac{\text{乙醛酸}}{\text{琥珀酸}} = 1.0$$

(b) 异柠檬酸 = 0.0591 M, 乙醛酸 = 0.0409 M, 琥珀酸 = 0.0409 M

$$\frac{\text{异柠檬酸}}{\text{乙醛酸}} = 1.44 \quad \frac{\text{乙醛酸}}{\text{琥珀酸}} = 1.0$$

(c) 异柠檬酸 = 0.0022 M, 乙醛酸 = 0.0078 M, 琥珀酸 = 0.0078 M

$$\frac{\text{异柠檬酸}}{\text{乙醛酸}} = 0.282 \quad \frac{\text{乙醛酸}}{\text{琥珀酸}} = 1.0$$

(d) 异柠檬酸 = $3.3 \times 10^{-5} \text{ M}$, 乙醛酸 = $9.67 \times 10^{-4} \text{ M}$, 琥珀酸 = $9.67 \times 10^{-4} \text{ M}$

$$\frac{\text{异柠檬酸}}{\text{乙醛酸}} = 0.034 \quad \frac{\text{乙醛酸}}{\text{琥珀酸}} = 1.0$$

(e) 异柠檬酸 = $\sim 0 \text{ M}$, 乙醛酸 = $\sim 1 \times 10^{-4} \text{ M}$, 琥珀酸 = $\sim 1 \times 10^{-4} \text{ M}$

$$\frac{\text{异柠檬酸}}{\text{乙醛酸}} = \sim 0 \quad \frac{\text{乙醛酸}}{\text{琥珀酸}} = 1.0$$

14. (a) 丙酮酸 + β -羟基丁酸 \rightarrow 乳酸 + 乙酰乙酸; (b) 丙酮酸还原成乳酸, β -羟基丁酸氧化成乙酰乙酸, 丙酮酸是氧化剂, β -羟基丁酸是还原剂; (c) $\Delta E'_0 = +0.100$ 伏, $\Delta G' = -4612$ 卡/摩尔, $K'_{\text{平}} = 2408$.

15. (a) 泛醌 + 琥珀酸 \rightarrow 泛醌-H₂ + 延胡索酸;

(b) $\Delta E = +0.070$ 伏, $\Delta G' = -3228.8$ 卡/摩尔, $K'_{\text{平}} = 233$.

16. (a) -0.149 伏, (b) -0.081 伏, (c) -0.06 伏, (d) -0.046 伏, (e) -0.019 伏, (f) +0.017 伏.

17. (a) $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+] = 1.22 \times 10^{-5}$ [方程(33)], (b) $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+] = 1.22 \times 10^{-3}$.

18. (a) $E'_{\text{opH9}} = E'_{\text{opH7}} - (0.059)(2) \therefore E'_{\text{opH9}} = -0.293$ 伏; (b) $E'_{\text{opH9}} = E'_{\text{opH7}}$, 因为反应中没有 H⁺. $\therefore E'_{\text{opH9}} = +0.771$ 伏.

19. (a) $\sim 6\text{ATP}$ /摩尔 S 氧化, (b) $\sim 3\text{ATP}$ /摩尔 NH₄⁺ 氧化.

20. 脂肪酸, 因为其酸比糖的还原程度更高(每摩尔燃烧更多的氢). 己酸氧化时的 $\Delta G'$ 要比果糖氧化时的 $\Delta G'$ 更负.

21. 18 摩尔 ATP/摩尔乙醇.

22. $\Delta G = (2)(1364)\Delta\text{pH}$. 在给定条件下, $\Delta G = 6336$ 卡/摩尔. $\therefore \Delta\text{pH} = 2.32$.

23. (a) $\delta = 109,808$ 卡/爱因斯坦, (b) $\delta = 38,067$ 卡/爱因斯坦.

24. $\sim 2\text{ATP}$ 效率为 40—50% 时.

25. (a) $\Delta G = -543$ 卡/摩尔, (b) $\Delta G = +543$ 卡/摩尔(即, 每移出 1 摩尔 Cl⁻ 需要 543 卡能量).

26. 在 37°C, $\Delta G = 1419 \Delta\text{pH} \therefore \Delta G = 7518$ 卡/摩尔.

27. (a) $\Delta G = ZF\Delta\psi \therefore \Delta G = -13.838$ 卡/摩尔, (b) $\sim 10^{10}$.

28. $\Delta H = -70,000$ 卡/摩尔, $\Delta G' = -65,314$ 卡/摩尔, $T\Delta S = -4686$ 卡/摩尔, $\Delta S = -15.7_{\text{e.u.}}$ 于 25°C(298 K).

29. (a) $\Delta H = -11,092$ 卡/摩尔. $\Delta G' = -2568$ 卡/摩尔, $T\Delta S = -8524$ 卡/摩尔, $\Delta S = -27.5_{\text{e.u.}}$.
(b) 在 28°C $K'_{\text{平}} = 111.4$.

30. v 在 37°C 时, 比 15°C 时大 3.77 倍.

第四章 酶

1. (a) $K_m = 10^{-5} M$, $V_{\text{最大}} = 120 \times 10^{-9} M/\text{分钟}$, (b) 通过 v 对 $[\text{S}]$ 作图展示出双曲线, 和 $1/v$ 对 $1/[\text{S}]$ 作图展示出一条直线, 而证明该酶遵循了双曲线饱和和动力学. 你也可指出原始的 v 对 $[\text{S}]$ 的数据得到了同样的 K_m 值, 不考虑代入 Michaelis-Menten 方程中的是那些值. (c) 0.012分^{-1} .

2. (a) 0.107 纤摩尔 $\times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$, (b) 26.6 纤摩尔 $\times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$, (c) 37.7 纤摩尔 $\times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$, (d) 114.2 纤摩尔 $\times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$, (e) 128 纤摩尔 $\times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1} = V_{\text{最大}}$.

3. v 的每一个指示值应当是大 5 倍.

4. (a) $k_f = V_{\text{最大}}/K_{mS} = 0.168 \text{分}^{-1}$, (b) $k_r = k_f/K_{\text{平}} = 84 \times 10^{-5} \text{分}^{-1}$, (c) $V_{\text{最大}}/K_{mP} = k_r = 8.4 \times 10^{-5} \text{分}^{-1}$.

5. $v_{\text{净}} = -5.4$ 微摩尔 $\times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1} (\text{P} \rightarrow \text{S})$.

6. (a) 5.4 微摩尔/升, (b) 8.55 微摩尔/升, (c) 16.2 微摩尔/升, (d) 28.62 微摩尔/升, (e) $2.7 \times 10^{-2}\%$, $4.28 \times 10^{-2}\%$, $8.1 \times 10^{-2}\%$, $14.31 \times 10^{-2}\%$.

7. (a) $2.1 \times 10^{-6} M$ (在 5 分钟时), (b) $3.9 \times 10^{-6} M$ (在 10 分钟时).

8. (a) 22.4% , (b) 22.4% , (c) 1.52×10^{-6} 摩尔 $\times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$, (d) 13.7 分钟, (e) 27.4 分钟 ($k = 0.051 \text{分}^{-1}$).

9. (a) 361, (b) 16, (c) 9, (d) 3.

10. $1/v = "2" = 0.02$, $V_{\text{最大}} = 1/0.02 = 50$ 纤摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$, $1/[S] = "4" = 4 \times 10^4$, $K_m = 1/(4 \times 10^4) = 2.5 \times 10^{-5} M$.

11. (a) $[PS] = 0.65 \times 10^{-6} M$, (b) $[P] = 0.50 \times 10^{-6} M$, $[P]_i = 1.15 \times 10^{-6} M$, (c) $K_s = 6 \times 10^{-7} M$.
Scatchard 线图用在 $[S]_i$ 的不同浓度下的数据会得到更可靠的估算, 而且也可以确定是否仅存在一种类型的结合部位。

12. 成年人肝提取物的倒数线图确定了其动力学常数 $K_m = 3 \times 10^{-4} M$, $V_{\text{最大}} = 20$ 微摩尔/毫克蛋白质。胚胎肝提取物的动力学常数为 $K_m = 5 \times 10^{-5} M$ 和 $V_{\text{最大}} = 20$ 微摩尔/毫克蛋白质。不同的 K_m 值表示出成人和胚胎肝提取物中的酶在动力学上是不同的。它们可能是两种基因的产物, 或另一方面, 成人肝中的酶可能是胚胎中酶的一种变型。相同的 $V_{\text{最大}}$ 值可能是巧合性的, 因为 $V_{\text{最大}} = k_p[E]$ 。于是, 一种提取液可能含有较高的浓度和较低的催化速度常数。另一种可能性是这两种酶确实是相同的, 而且以同样浓度存在, 但是在成年人的组织提取液中, 含有一种能增大 K_m 表观值的竞争性抑制剂。

13. 倒数线图表示出存在于血浆中酶的 K_m 是 $3 \times 10^{-4} M$ 。因此, 诊断为肝损伤比诊断为运动过度更可靠些(假定不存在能够改变 K_m 值的抑制剂或活化剂)。

14. (a) 17.6 纤摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$, 87%; (b) $v_i = 3.7$ 纤摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$, 91.8%; (c) $v_i = 210.2$ 纤摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$, 1.3%。

15. (a) $3.7 \times 10^{-4} M$, (b) $2.93 \times 10^{-2} M$ 。

16. $6.66 \times 10^{-5} M$ 。

17. (a) 20.7 纤摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$, (b) 89.3%。

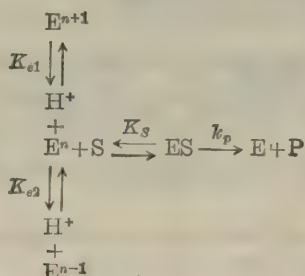
18. $[S]_i = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)[S]_0$ 。

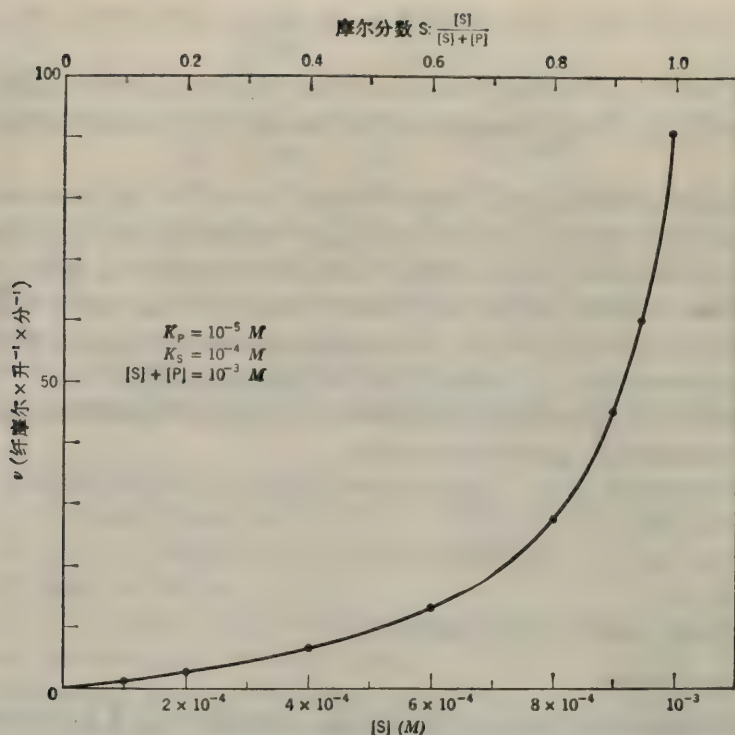
19. 对照数据(或倒数线图)提供 $K_m = 1 \times 10^{-3} M$, $V_{\text{最大}} = 100$ 纤摩尔/分。I 是竞争性抑制剂(该倒数线图交对照曲线于 $V_{\text{最大}}$), $K_i = 3 \times 10^{-6} M$ (从倒数线图的斜率或从 K_m 表观值计算得出的)。X 是非竞争性抑制剂(倒数作图交对照曲线的 $1/[S]$ 轴于 $-\frac{1}{K_m}$)。 $K_i = 1.5 \times 10^{-5} M$ (从倒数作图的斜率或从 $1/v$ 轴的截距计算得到的)。Y 是反竞争性抑制剂(倒数线图与对照线图是平行的)。 $K_i = 1 \times 10^{-3} M$ (从倒数作图的 $1/v$ 轴的截距或者从 K_m 表观值计算的)。Z 是混合型抑制剂(倒数线图与对照曲线图相交于 $1/v$ 轴的左侧, $1/[S]$ 轴的上方)。 $K_i = 2 \times 10^{-4} M$ (从倒数作图的斜率计算)。 $\alpha K_i = 8 \times 10^{-4} M$ (从 $1/v$ 轴的截距或 $1/[S]$ 交点的坐标计算的)。于是, $\alpha = 4$ 。

20. v 对 $[S]$ 的线图表示在图 PP-4-1 中。这是“能量负载(energy-charge)”类型曲线的一个例子。S 和 P 可以分别为 ATP 和 ADP。在本题叙述的反应中 ATP 转换为 ADP, 但是总的核苷酸合并量保持不变。因此, 如 ATP 的浓度增大, 引起不寻常的速度曲线的产物抑制作用同时降低。如果 $[S]/[P]$ 的比率恒定在大约 $9 \times 10^{-4} M$, v 对这个比率的很小的变化将是极端灵敏的。能量负载的特征曲线只有在 $K_P < K_S$ 时才能看到, 即当酶对产物的亲和力比对底物的亲和力高时才能见到。

21. $pH_{\text{最适}} = \frac{1}{2}(pK_a + pK_b) = 5.5$ 。

22. 这里除了两个可离子化的基团是酶上面的以外, 情况与练习题 21 中叙述的相同。(a) $pH_{\text{最适}} = 5.5$, (b) 该反应是





PP-4-1(练习题 20) 能量负载特征曲线, 其中 $[S] + [P]$ 是恒定的而 P 是一个产物抑制剂。

式中 $E^n = {}^+HN-E-COO^-$, $E^{n+1} = {}^+HN-E-COOH$, $E^{n-1} = N-E-COO^-$ 。如 $[H^+]$ 浓度接近 K_{e1} 时(即该 pH 降低趋向 pK_{e1}) 它的作用像竞争性抑制剂。如 $[H^+]$ 浓度降低可以看到对倒数线图的斜率同样的影响(即如 pH 增大趋向 pK_{e2} 而以盲端 E^{n-1} 形式积累)。该速度方程可以按照一般原则写成。

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{\frac{[S]}{K_s}}{1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[H^+]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H^+]}}$$

或

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[S]}{K_s \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H^+]} \right) + [S]}$$

式中, $K_{e2}/[H^+]$ 一项代表与 E^n 有关的 E^{n-1} 的浓度。

23. (a) $E_a = 11,828$ 卡/摩尔, (b) $Q_{10} = 1.92$ 。

24. (a) 1.6×10^{-3} 微摩尔/分, (b) 16 微摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$, (c) 3.33×10^{-3} 微摩尔 \times 毫克蛋白质 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$, (d) 0.08 单位/毫升, (e) 0.0033 单位/毫克蛋白质。

25. (a) 88.5% , (b) 2.95 倍。

26. (a) $43,200(S \rightarrow P \text{ 摩尔数}) \times \text{摩尔酶}^{-1} \times \text{分}^{-1}$, (b) 2.3×10^{-5} 分钟。

27. (a) $V_{\text{最大}} = 3.6 \times 10^{-4}$ 摩尔/分 $= 3.6 \times 10^{-1}$ 微摩尔 \times 毫升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1} = 0.36$ 单位/毫升, (b) $[E] \times t =$ 常数。因此, $t = 90$ 分。

28. (a) 4.72 纤摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$, (b) 29.79 纤摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$ 。

$$29. (a) \frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[A]}{K_{m,A} \left(1 + \frac{K_{i,A} K_{m,B}}{K_{m,A} [B]} \right) + [A] \left(1 + \frac{K_{m,B}}{[B]} \right)} = \frac{[A]}{K_{m,A} (\text{斜率系数}) + [A] (\text{截距系数})}$$

$$(b) \quad \frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[B]}{K_{mB} \left(1 + \frac{K_{ia}}{[A]}\right) + [B] \left(1 + \frac{K_{mA}}{[A]}\right)} = \frac{[B]}{K_{mB}(\text{斜率系数}) + [B](\text{截距系数})}$$

30. 快速平衡有序二底物系统初速度研究的方程是

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[A]}{K_A \left(\frac{K_B}{[B]}\right) + [A] \left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)} = \frac{[A]}{K_A(\text{斜率系数}) + [A](\text{截距系数})}$$

和

$$\frac{v}{V_{\text{最大}}} = \frac{[B]}{K_B \left(1 + \frac{K_A}{[A]}\right) + [B]} = \frac{[B]}{K_B(\text{斜率系数}) + [B]}$$

快速平衡系统不像恒态系统, 如[B]接近无限大时 $1/v$ 对 $1/[A]$ 线图的斜率趋于零(如[B]增大, 斜率系数 $K_B/[B]$ 项变的很小)。也不像恒态系统 $1/v$ 对 $1/[B]$ 的线图交纵轴于 $1/V_{\text{最大}}$ (没有截距系数——分母[B]项不乘含[A]的项)。

31. $a < 1, b > 1, c < 1, b > 1$ (负协同性) 表明第二个底物分子的结合, 对于第三个底物分子的结合更困难。

32. $V_{\text{最大}} = 100$ 微摩尔 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$, $[S]_{0.5} = 5 \times 10^{-3} M$, v 对 $[S]$ 线图是 S 形的。希尔线图的斜率 = 2 (即 $n_H = 2$)。 $K' = 2.5 \times 10^{-5} M^2$ 。

33. (a) $n_H = 2$, (b) $[S]_{0.9}/[S]_{0.1} = 3$ 。

34. $L = 49.7$ 。

35. 平行的法则要求 $L \times K_{SR} = K_{ST} \times L_1$,

$$\therefore L_1 = L(K_{SR})/K_{ST} \text{ 或 } L_1 = Lc,$$

同样,

$$L_2 = Lc^2, \quad L_3 = Lc^3, \quad \text{和} \quad L_4 = Lc^4.$$

36. (a) 45 单位 \times 克组织 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$, (b) 0.053 分 $^{-1}$, (c) 25.44 单位 \times 克组织 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$ 。

第五章 分光光度法及其它光学方法

1. (a) 在 260 nm 处: $A = 0.33, I = 0.468$. 在 340 nm 处: $A = 0.137, I = 0.730$. (b) 在 260 nm 处: $A = 0.752, I = 0.177$. 在 340 nm 处: $A = 0.044, I = 0.905$.

2. (a) $[NADPH] = 2.41 \times 10^{-5} M$, $[ATP] = 3.50 \times 10^{-5} M$,

(b) $[NADPH] = 0$, $[ATP] = 4.87 \times 10^{-5} M$,

(c) $[NADPH] = 3.54 \times 10^{-5} M$, $[ATP] = 0$.

3. $[A] = 1.26 \times 10^{-5} M$, $[B] = 1.11 \times 10^{-5} M$.

4. (a) 0.207 毫克/毫升, (b) 该酶制剂中的蛋白质可能不具有像牛血清清蛋白中同样的一般芳香氨基酸成分。

5. (a) 223.2 微克/毫升 = 0.223. (b) 是的 -215 nm 和 225 nm 处的吸收率来自肽键。

6. 在原始 1.5 毫升溶液中 $[GSSG] = 1.196 \times 10^{-4} M$.

7. 向未知溶液中加入含过量的 NAD^+ , P_i 及甘油醛-3-磷酸脱氢酶溶液, GAP 即转化成 1,3-DiPGA. 溶液中每有一摩尔 GAP, 将产生一摩尔 NADH. 再加入磷酸丙糖异构酶使 DHAP 转化成 GAP, 进而转变成 1,3-DiPGA. 溶液中每有一摩尔 DHAP 就可产生一摩尔 DHAP. 最后, 加入醛缩酶, 促使 FDP 转化成 GAP 及 DHAP, 它们可进而转化成 1,3-DiPGA. 故每有一摩尔 FDP, 可产生两摩尔 NADH. 用砷酸代替磷酸是为了保证甘油醛-3-磷酸脱氢酶反应进行到底(无水的丙糖-1-砷酸会自发水解)。

8. $[柠檬酸] = 1.35 \times 10^{-4} M$, $[异柠檬酸] = 1.35 \times 10^{-4} M$.

9. 0.262 的 A_{340nm} 相当于 $4.23 \times 10^{-5} M$ 的 $[NADPH]$. 因此, 测定中的 APS 浓度是 $4.23 \times 10^{-5} M$.

原始溶液含有 $(4.23 \times 10^{-5})(1.0)/0.9 = 4.7 \times 10^{-5} M$ 的 APS. 原始溶液中的核苷酸的总浓度是 $5.84 \times 10^{-5} M$. 因而, 制剂为 80% APS.

10. $A_{420nm} = 0.105$.

11. (a) 0.232 单位/毫升. (b) 1.93 单位/毫克蛋白质.

12. 0.08/分的 $\Delta A_{365nm} \triangleq 2.57 \times 10^{-5} M \times \text{分}^{-1}$ 的 $\Delta C = 25.7 \times 10^{-6} M \times \text{分}^{-1} = 25.7 \text{ 微摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1} = 0.0257 \text{ 微摩尔} \times \text{毫升}^{-1} \times \text{分}^{-1} = 0.0257 \text{ 单位/毫升}$. 该甘油激酶溶液含 0.257 单位/毫升(规定活性的 85.7%).

13. 该测定混合物含有 1.094 微克/25 毫升. 尿中含有 2.19 微克/毫升. 排泄量为 1750 微克/24 小时, 显著地超过了正常量.

14. (a) -5.12° (b) -794.6° .

15. 0.226 克/毫升.

16. $\alpha = 67.5\%$, $\beta = 32.5\%$.

17. $A^\circ = [\alpha] \times c \times l$; $A^\circ_B = A^\circ_\alpha + A^\circ_\beta$, $c = 0.5 \text{ 克/毫升}$, 在 10 分钟时, β 型代表了总量(0.080 克/毫升)的 16.0%. $\therefore v = 8.0 \text{ 毫克} \times \text{毫升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$.

第六章 生物化学中的同位素

1. (a) $^{45}_{20}\text{Ca} \longrightarrow {}_{-1}^{60}\text{Sc} + ^{45}_{21}\text{Sc}$, (b) $^{36}_{17}\text{Cl} \longrightarrow {}_{-1}^{60}\text{Cl} + ^{36}_{18}\text{Ar}$, (c) $^{42}_{19}\text{K} \longrightarrow {}_{-1}^{60}\text{K} + ^{42}_{20}\text{Ca}$, (d) $^{33}_{16}\text{P} \longrightarrow {}_{-1}^{60}\text{P} + ^{33}_{16}\text{S}$.

2. (a) 0.173 年 $^{-1}$, 4.75×10^{-4} 天 $^{-1}$, 1.98×10^{-5} 时 $^{-1}$, 3.30×10^{-7} 分 $^{-1}$, 5.49×10^{-9} 秒 $^{-1}$, (b) 82.9%.

3. (a) 现存的每 11.7 放射性原子每天有一个原子衰变, 每 16, 831 放射性原子每分钟有一个原子衰变. (b) 12.3×10^4 居里/克, 16.11×10^6 居里/克-原子, 2.73×10^{17} DPM/克.

4. 23%.

5. (a) 18.25×10^6 居里/摩尔 (18.25×10^3 毫居里/微摩尔), (b) $4.93 \times 10^{-6}\%$.

6. 5.62×10^{-8} 克/毫居里.

7. (a) $3.57 \times 10^{-8} M$, (b) 8.63×10^8 CPM/毫升.

8. (a) 1.56 毫居里/毫克, (b) 227.7 毫居里/毫摩尔, (c) 5.05×10^8 DPM/微摩尔, (d) 6.74×10^7 CPM/微摩尔碳.

9. 取 11 微升放射性 L-半胱氨酸- ^{35}S 储备液加 0.1189 克固态未标记含水 L-半胱氨酸氯化氢, 并溶于水或缓冲液中以制成 75 毫升溶液.

10. 取 3.38 毫升放射性葡萄糖- ^{14}C 储备液加 2.92 毫克固态未标记的葡萄糖, 并溶于水以制成 50 毫升溶液.

11. (a) 9.33×10^{-4} 微摩尔/分, (b) $0.622 \text{ 微摩尔} \times \text{升}^{-1} \times \text{分}^{-1}$, (c) $1.30 \times 10^{-8} \text{ 微摩尔} \times \text{毫克蛋白质}^{-1} \times \text{分}^{-1}$.

12. 6 升.

13. 数据与计算表示如下:

“负”室不含蛋白质 = [S]	$1870\text{CPM}/10 \text{ 微升} = 1.87 \times 10^{-6} \text{ 微摩尔}/10 \text{ 微升}$ $= 1.87 \times 10^{-7} \text{ 微摩尔/微升} = 1.87 \times 10^{-7} M$
“正”室含蛋白质 = [S] + [PS]	$2570\text{CPM}/10 \text{ 微升} = 2.57 \times 10^{-6} \text{ 微摩尔}/10 \text{ 微升}$ $= 2.57 \times 10^{-7} \text{ 微摩尔/微升} = 2.57 \times 10^{-7} M$
[PS] = 差	$700\text{CPM}/10 \text{ 微升} = 0.7 \times 10^{-6} \text{ 微摩尔}/10 \text{ 微升}$ $= 0.7 \times 10^{-7} \text{ 微摩尔/微升} = 0.7 \times 10^{-7} M$
[P],	$6 \times 10^{-6} \text{ 克/毫升} = 6 \times 10^{-3} \text{ 克/升}$

$$\frac{6 \times 10^{-3} \text{ 克/升}}{6.0 \times 10^3 \text{ 克/摩尔}} = 0.1 \times 10^{-6} \text{ 摩尔/升} = 1 \times 10^{-7} M$$

$$[P] = [P]_i - [PS] \quad [P] = (1 \times 10^{-7}) - (0.7 \times 10^{-7}) = 0.3 \times 10^{-7} M$$

$$K_s = \frac{[P][S]}{[PS]} = \frac{(3 \times 10^{-8})(1.87 \times 10^{-7})}{(7 \times 10^{-8})} = 8.01 \times 10^{-8} M$$

-
14. (a) 7965 CPM/微摩尔, (b) 6761 CPM/微摩尔, (c) 4494 CPM/微摩尔.
15. $^{14}\text{C} = 158,000 \text{ DPM}$, $^{32}\text{P} = 265,000 \text{ DPM}$.
16. (a) $t_{1/2(\text{有效})} = 4.085$ 小时, $t_{1/2(\text{生物})} = 6$ 小时. (b) S. A. 于零时 = 10,000 CPM/毫升.
17. 0.0128 M.
18. 173.2 微克.
19. 85.35 毫克/50 毫升 = 1.71 毫克/毫升.
20. 51.8 微摩尔.
21. 每 3.09×10^8 摩尔的酶有 6.19×10^{-8} 摩尔反应性 SH 或 2SH/分子.
22. (a) 已知的 10,000 CPM 中回收了 6720 CPM (67.2%), 该样品未猝灭的活性是 32,068 CPM.
 (b) 在样品计数的同样猝灭条件下测定 P^{32}P_4 的比活性 (即木炭存在时).

对数表

自然数	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	比 例 部 分								
											1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	0000	0043	0086	0128	0170	0212	0253	0294	0334	0374	4	8	12	17	21	25	29	33	37
11	0414	0453	0492	0531	0569	0607	0645	0682	0719	0755	4	8	11	15	19	23	26	30	34
12	0792	0828	0864	0899	0934	0969	1004	1038	1072	1106	3	7	10	14	17	21	24	28	31
13	1139	1173	1206	1239	1271	1303	1335	1367	1399	1430	3	6	10	13	16	19	23	26	29
14	1461	1492	1523	1553	1584	1614	1644	1673	1703	1732	3	6	9	12	15	18	21	24	27
15	1761	1790	1818	1847	1875	1903	1931	1959	1987	2014	3	6	8	11	14	17	20	22	25
16	2041	2068	2095	2122	2148	2175	2201	2227	2253	2279	3	5	8	11	13	16	18	21	24
17	2304	2330	2355	2380	2405	2430	2455	2480	2504	2529	2	5	7	10	12	15	17	20	22
18	2553	2577	2601	2625	2648	2672	2695	2718	2742	2765	2	5	7	9	12	14	16	19	21
19	2788	2810	2833	2856	2878	2900	2923	2945	2967	2989	2	4	7	9	11	13	16	18	20
20	3010	3032	3054	3075	3096	3118	3139	3160	3181	3201	2	4	6	8	11	13	15	17	19
21	3222	3243	3263	3284	3304	3324	3345	3365	3385	3404	2	4	6	8	10	12	14	16	18
22	3424	3444	3464	3483	3502	3522	3541	3560	3579	3598	2	4	6	8	10	12	14	15	17
23	3617	3636	3655	3674	3692	3711	3729	3747	3766	3784	2	4	6	7	9	11	13	15	17
24	3802	3820	3838	3856	3874	3892	3909	3927	3945	3962	2	4	5	7	9	11	12	14	16
25	3979	3997	4014	4031	4048	4065	4082	4099	4116	4133	2	3	5	7	9	10	12	14	15
26	4150	4166	4183	4200	4216	4232	4249	4265	4281	4298	2	3	5	7	8	10	11	13	15
27	4314	4330	4346	4362	4378	4393	4409	4425	4440	4456	2	3	5	6	8	9	11	13	14
28	4472	4487	4502	4518	4533	4548	4564	4579	4594	4609	2	3	5	6	8	9	11	12	14
29	4624	4639	4654	4669	4683	4698	4713	4728	4742	4757	1	3	4	6	7	9	10	12	13
30	4771	4786	4800	4814	4829	4843	4857	4871	4886	4900	1	3	4	6	7	9	10	11	13
31	4914	4928	4942	4955	4969	4983	4997	5011	5024	5038	1	3	4	6	7	8	10	11	12
32	5051	5065	5079	5092	5105	5119	5132	5145	5159	5172	1	3	4	5	7	8	9	11	12
33	5185	5198	5211	5224	5237	5250	5263	5276	5289	5302	1	3	4	5	6	8	9	10	12
34	5315	5328	5340	5353	5366	5378	5391	5403	5416	5428	1	3	4	5	6	8	9	10	11
35	5441	5453	5465	5478	5490	5502	5514	5527	5539	5551	1	2	4	5	6	7	9	10	11
36	5563	5575	5587	5599	5611	5623	5635	5647	5658	5670	1	2	4	5	6	7	8	10	11
37	5682	5694	5705	5717	5729	5740	5752	5763	5775	5786	1	2	3	5	6	7	8	9	10
38	5798	5809	5821	5832	5843	5855	5866	5877	5888	5899	1	2	3	5	6	7	8	9	10
39	5911	5922	5933	5944	5955	5966	5977	5988	5999	6010	1	2	3	4	5	7	8	9	10
40	6021	6031	6042	6053	6064	6075	6085	6096	6107	6117	1	2	3	4	5	6	8	9	10
41	6128	6138	6149	6160	6170	6180	6191	6201	6212	6222	1	2	3	4	5	6	7	8	9
42	6232	6243	6253	6263	6274	6284	6294	6304	6314	6325	1	2	3	4	5	6	7	8	9
43	6335	6345	6355	6365	6375	6385	6395	6405	6415	6425	1	2	3	4	5	6	7	8	9
44	6435	6444	6454	6464	6474	6484	6493	6503	6513	6522	1	2	3	4	5	6	7	8	9
45	6532	6542	6551	6561	6571	6580	6590	6599	6609	6618	1	2	3	4	5	6	7	8	9
46	6628	6637	6646	6656	6665	6675	6684	6693	6702	6712	1	2	3	4	5	6	7	7	8
47	6721	6730	6739	6749	6758	6767	6776	6785	6794	6803	1	2	3	4	5	5	6	7	8
48	6812	6821	6830	6839	6848	6857	6866	6875	6884	6893	1	2	3	4	4	5	6	7	8
49	6902	6911	6920	6928	6937	6946	6955	6964	6972	6981	1	2	3	4	4	5	6	7	8
50	6990	6998	7007	7016	7024	7033	7042	7050	7059	7067	1	2	3	3	4	5	6	7	8
51	7076	7084	7093	7101	7110	7118	7126	7135	7143	7152	1	2	3	3	4	5	6	7	8
52	7160	7168	7177	7185	7193	7202	7210	7218	7226	7235	1	2	2	3	4	5	6	7	7
53	7243	7251	7259	7267	7275	7284	7292	7300	7308	7316	1	2	2	3	4	5	6	6	7
54	7324	7332	7340	7348	7356	7364	7372	7380	7388	7396	1	2	2	3	4	5	6	6	7

(续表)

自然数	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	比 例 部 分								
											1	2	3	4	5	6	7	8	9
55	7404	7412	7419	7427	7435	7443	7451	7459	7466	7474	1	2	2	3	4	5	5	6	7
56	7482	7490	7497	7505	7513	7520	7528	7536	7543	7551	1	2	2	3	4	5	5	6	7
57	7559	7566	7574	7582	7589	7597	7604	7612	7619	7627	1	2	2	3	4	5	5	6	7
58	7634	7642	7649	7657	7664	7672	7679	7686	7694	7701	1	1	2	3	4	4	5	6	7
59	7709	7716	7723	7731	7738	7745	7752	7760	7767	7774	1	1	2	3	4	4	5	6	7
60	7782	7789	7796	7803	7810	7818	7825	7832	7839	7846	1	1	2	3	4	4	5	6	6
61	7853	7860	7868	7875	7882	7889	7896	7903	7910	7917	1	1	2	3	4	4	5	6	6
62	7924	7931	7938	7945	7952	7959	7966	7973	7980	7987	1	1	2	3	3	4	5	6	6
63	7993	8000	8007	8014	8021	8028	8035	8041	8048	8055	1	1	2	3	3	4	5	5	6
64	8062	8069	8075	8082	8089	8096	8102	8109	8116	8122	1	1	2	3	3	4	5	5	6
65	8129	8136	8142	8149	8156	8162	8169	8176	8182	8189	1	1	2	3	3	4	5	5	6
66	8195	8202	8209	8215	8222	8228	8235	8241	8248	8254	1	1	2	3	3	4	5	5	6
67	8261	8267	8274	8280	8287	8293	8299	8306	8312	8319	1	1	2	3	3	4	5	5	6
68	8325	8331	8338	8344	8351	8357	8363	8370	8376	8382	1	1	2	3	3	4	4	5	6
69	8388	8395	8401	8407	8414	8420	8426	8432	8439	8445	1	1	2	2	3	4	4	5	6
70	8451	8457	8463	8470	8476	8482	8488	8494	8500	8506	1	1	2	2	3	4	4	5	6
71	8513	8519	8525	8531	8537	8543	8549	8555	8561	8567	1	1	2	2	3	4	4	5	5
72	8573	8579	8585	8591	8597	8603	8609	8615	8621	8627	1	1	2	2	3	4	4	5	5
73	8633	8639	8645	8651	8657	8663	8669	8675	8681	8686	1	1	2	2	3	4	4	5	5
74	8692	8698	8704	8710	8716	8722	8727	8733	8739	8745	1	1	2	2	3	4	4	5	5
75	8751	8756	8762	8768	8774	8779	8785	8791	8797	8802	1	1	2	2	3	3	4	5	5
76	8808	8814	8820	8825	8831	8837	8842	8848	8854	8859	1	1	2	2	3	3	4	5	5
77	8865	8871	8876	8882	8887	8893	8899	8904	8910	8915	1	1	2	2	3	3	4	4	5
78	8921	8927	8932	8938	8943	8949	8954	8960	8965	8971	1	1	2	2	3	3	4	4	5
79	8976	8982	8987	8993	8998	9004	9009	9015	9020	9026	1	1	2	2	3	3	4	4	5
80	9031	9036	9042	9047	9053	9058	9063	9069	9074	9079	1	1	2	2	3	3	4	4	5
81	9085	9090	9096	9101	9106	9112	9117	9122	9128	9133	1	1	2	2	3	3	4	4	5
82	9138	9143	9149	9154	9159	9165	9170	9175	9180	9186	1	1	2	2	3	3	4	4	5
83	9191	9196	9201	9206	9212	9217	9222	9227	9232	9238	1	1	2	2	3	3	4	4	5
84	9243	9248	9253	9258	9263	9269	9274	9279	9284	9289	1	1	2	2	3	3	4	4	5
85	9294	9299	9304	9309	9315	9320	9325	9330	9335	9340	1	1	2	2	3	3	4	4	5
86	9345	9350	9355	9360	9365	9370	9375	9380	9385	9390	1	1	2	2	3	3	4	4	5
87	9395	9400	9405	9410	9415	9420	9425	9430	9435	9440	0	1	1	2	2	3	3	4	4
88	9445	9450	9455	9460	9465	9469	9474	9479	9484	9489	0	1	1	2	2	3	3	4	4
89	9494	9499	9504	9509	9513	9518	9523	9528	9533	9538	0	1	1	2	2	3	3	4	4
90	9542	9547	9552	9557	9562	9566	9571	9576	9581	9586	0	1	1	2	2	3	3	4	4
91	9590	9595	9600	9605	9609	9614	9619	9624	9628	9633	0	1	1	2	2	3	3	4	4
92	9638	9643	9647	9652	9657	9661	9666	9671	9675	9680	0	1	1	2	2	3	3	4	4
93	9685	9689	9694	9699	9703	9708	9713	9717	9722	9727	0	1	1	2	2	3	3	4	4
94	9731	9736	9741	9745	9750	9754	9759	9763	9768	9773	0	1	1	2	2	3	3	4	4
95	9777	9782	9786	9791	9795	9800	9805	9809	9814	9818	0	1	1	2	2	3	3	4	4
96	9823	9827	9832	9836	9841	9845	9850	9854	9859	9863	0	1	1	2	2	3	3	4	4
97	9868	9872	9877	9881	9886	9890	9894	9899	9903	9908	0	1	1	2	2	3	3	4	4
98	9912	9917	9921	9926	9930	9934	9939	9943	9948	9952	0	1	1	2	2	3	3	4	4
99	9956	9961	9965	9969	9974	9978	9983	9987	9991	9996	0	1	1	2	2	3	3	4	4

收到期 83年5月4日

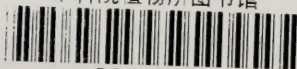
来源 44.42(18#)

书价 3.10

单据号 25831

开票日期 83.5.4

中科院植物所图书馆



S0017424

元素的原子序数和原子量

元素名称		符号	原子序数	原子量	元素名称		符号	原子序数	原子量
英文	中文				英文	中文			
Aluminum	铝	Al	13	26.97	Neodymium	钕	Nd	60	144.27
Antimony	锑	Sb	51	121.76	Neon	氖	Ne	10	20.183
Argon	氩	A	18	39.944	Nickel	镍	Ni	28	58.69
Arsenic	砷	As	33	74.91	Niobium	铌	Nb	41	92.91
Barium	钡	Ba	56	137.36	Nitrogen	氮	N	7	14.008
Beryllium	铍	Be	4	9.02	Osmium	锇	Os	76	190.2
Bismuth	铋	Bi	83	209.00	Oxygen	氧	O	8	16.000
Boron	硼	B	5	10.82	Palladium	钯	Pd	46	106.7
Bromine	溴	Br	35	79.916	Phosphorus	磷	P	15	30.98
Cadmium	镉	Cd	48	112.41	Platinum	铂	Pt	78	195.23
Calcium	钙	Ca	20	40.08	Potassium	钾	K	19	39.096
Carbon	碳	C	6	12.01	Praseodymium	镨	Pr	59	140.92
Cerium	铈	Ce	58	140.13	Protactinium	镤	Pa	91	231
Cesium	铯	Cs	55	132.91	Radium	镭	Ra	88	226.05
Chlorine	氯	Cl	17	35.457	Radon	氡	Rn	86	222
Chromium	铬	Cr	24	52.01	Rhenium	铼	Re	75	186.31
Cobalt	钴	Co	27	58.94	Rhodium	铑	Rh	45	102.91
Copper	铜	Cu	29	63.57	Rubidium	铷	Rb	37	85.48
Dysprosium	镝	Dy	66	162.46	Ruthenium	钌	Ru	44	101.7
Erbium	铒	Er	68	167.2	Samarium	钐	Sm	62	150.43
Europium	铕	Eu	63	152.0	Scandium	钪	Sc	21	45.10
Fluorine	氟	F	9	19.00	Selenium	硒	Se	34	78.96
Gadolinium	钆	Gd	64	156.9	Silicon	硅	Si	14	28.06
Gallium	镓	Ga	31	69.72	Silver	银	Ag	47	107.880
Germanium	锗	Ge	32	72.60	Sodium	钠	Na	11	22.997
Gold	金	Au	79	197.2	Strontium	锶	Sr	38	87.63
Hafnium	铪	Hf	72	178.6	Sulfur	硫	S	16	32.06
Helium	氦	He	2	4.003	Tantalum	钽	Ta	73	180.88
Holmium	铥	Ho	67	164.94	Tellurium	碲	Te	52	127.61
Hydrogen	氢	H	1	1.0081	Terbium	铽	Tb	65	159.2
Indium	铟	In	49	114.76	Thallium	铊	Tl	81	204.39
Iodine	碘	I	53	126.92	Thorium	钍	Th	90	232.12
Iridium	铱	Ir	77	193.1	Thulium	铥	Tm	69	169.4
Iron	铁	Fe	26	55.84	Tin	锡	Sn	50	118.70
Krypton	氪	Kr	36	83.7	Titanium	钛	Ti	22	47.90
Lanthanum	镧	La	57	138.92	Tungsten	钨	W	74	183.92
Lead	铅	Pb	82	207.21	Uranium	铀	U	92	238.07
Lithium	锂	Li	3	6.940	Vanadium	钒	V	23	50.95
Lutecium	镥	Lu	71	175.00	Xenon	氙	Xe	54	131.3
Magnesium	镁	Mg	12	24.32	Ytterbium	镱	Yb	70	173.04
Manganese	锰	Mn	25	54.93	Yttrium	钇	Y	39	88.92
Mercury	汞	Hg	80	200.61	Zinc	锌	Zn	30	65.38
Molybdenum	钼	Mo	42	95.95	Zirconium	锆	Zr	40	91.22

58.173
207

012456

生物化学计标

借者单位	借者姓名	借出日期	还书日期
------	------	------	------

1. 类	彭小娟	85. 9. 9	
------	-----	----------	--

2. 类	彭小娟	89. 5. 5	
------	-----	----------	--

3. 类	彭小娟	95. 6. 3	
------	-----	----------	--

012456

统一书号: 13031-2(42)

定 价: 2.10 元

本社书号: 2930-13-10

科技新书目: 40-39